

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: analytická chemie



Mgr. Filip Kaftan

**Využití DESI/DAPPI-MS a MALDI-MS pro studium biologických
objektů**

**Utilization of DESI/DAPPI-MS and MALDI-MS for studying
biological objects**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Praha 2013

Tato práce zahrnuje výsledky získané v letech 2008-2013 během doktorského studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Samotná práce byla vypracována v laboratořích vědecko-servisní skupiny Hmotnostní spektrometrie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. a na spolupracujících pracovištích.

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze projektem číslo 162910, projekty GAČR 203/09/0139 a P206/12/0750, dále Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy v podobě výzkumného záměru RP 14/63, MSM 0021620857 a projektu SVV267215 a v neposlední řadě projektem podpory na rozvoj výzkumných organizací (RVO) číslo 61388963.

Školitel: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.
Vědecko-servisní skupina hmotnostní spektrometrie
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

Školitel- konzultant: doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.
Katedra analytické chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4.8.2013

Mgr. Filip Kaftan

ABSTRAKT (ČJ)

Předkládaná disertační práce byla cílena na využití desorpčně ionizačních technik hmotnostní spektrometrie ke studiu různorodých biologických vzorků.

Nedílnou součástí této práce byla konstrukce univerzální platformy pro ambientní ionizační techniky (AIT) v hmotnostní spektrometrii (MS) určené pro experimenty prováděné ve spojení s desorpční elektrosprejovou ionizací (DESI) a desorpční fotoionizací za atmosférického tlaku (DAPPI). V rámci vývoje byla původně manuální platforma pro AIT přestavěna na motorizovanou platformu softwarově ovládanou prostřednictvím uživatelského rozhraní hmotnostního spektrometru. Díky motorizované platformě tak bylo možné s definovanou velikostí kroku provádět jednorozměrné (1-D) a dvourozměrné (2-D) analýzy vzorků.

Zkonstruovaná platforma pro AIT v MS byla testována v případě DESI-MS režimu prostřednictvím modelového analytu rhodaminu B a pomocí reálných biologických vzorků v podobě vzorků rostliny oměj šalamounek. Testování platformy s využitím techniky DAPPI-MS bylo provedeno na biologických vzorcích novorozeněckého mázku.

Modelového analytu rhodaminu B bylo v rámci techniky DESI-MS využito ke studiu základních desorpčně ionizačních procesů, ke kterým v DESI během analýzy vzorků dochází. K experimentům, které byly konkrétně zaměřené na vznik a charakter povrchových struktur vznikajících při analýze na vzorkovacím povrchu z naneseného analytu, bylo využito i rastrovací elektronové mikroskopie a feritových nanočástic přidávaných do sprejovací kapaliny.

Na základě techniky DAPPI-MS byla vypracována metoda analýzy melaminu ve vzorcích mlék a smetany.

Ve spojení s přístupem zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI) bylo použito klasické desorpční techniky, a to ionizace za spoluúčasti matrice (MALDI), pomocí které byly studovány biologické vzorky hmyzu. První projekt aplikace techniky MALDI-MSI byl zaměřený na povrchovou analýzu vzorků much octomilek obecných za účelem studia distribuce samičích a samčích feromonů. Získané výsledky byly podpořeny na základě analýzy hexanových extraktů much pomocí plynové chromatografie. Druhý MALDI-MSI projekt byl studií vlastností nového fixačního média na bázi polymeru poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu (pHPMA)

v souvislosti se zhotovením a analýzou kryomikrotomických řezů vzorků čmeláka zemního.

Klíčová slova

Hmotnostní spektrometrie, konstrukce univerzální platformy pro AIT, MSI, DESI-MS, DAPPI-MS, MALDI-MS

ABSTRACT (EN)

Presented PhD thesis was aimed at the utilization of desorption ionization mass spectrometric techniques to study different types of biological samples.

An important part of this thesis was the construction of a universal platform for ambient ionization techniques (AIT) in mass spectrometry (MS) for the experiments performed in combination with desorption electrospray ionization (DESI) and desorption atmospheric pressure photoionization (DAPPI). Initially manual platform for AIT was during the development rebuild into a motorized platform operated by software via user interface of the mass spectrometer. Using the motorized platform it was possible to carry out a one-dimensional (1-D) and two dimensional (2-D) samples analysis with a defined step size of imaging.

Platform designed for AIT in MS was tested in DESI-MS mode by model analyte Rhodamine B and by plant samples which were represented by *Aconitum plicatum*. The platform was also tested on biological samples of vernix caseosa using DAPPI-MS ion source. Model analyte Rhodamine B was in DESI-MS technique used to study the basic desorption ionization processes occurring in the DESI during the sample analysis. In order to highlight the surface structures the colloidal solution of ferrite nanoparticles was added into the sprayed liquid. For the visualization of surface structures with high resolution the scanning electron microscopy was used.

Based on the DAPPI-MS technique a new method of melamine analysis in milk and cream samples was developed.

A classic desorption ionization technique namely matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) in combination with the imaging mass spectrometry (MSI) approach was used for studying of biological samples. The first project application of MALDI-MSI was focused on the surface analysis of *Drosophila melanogaster* flies in order to study the distribution of female's and male's pheromones. The results from MALDI-MSI of *D. melanogaster* flies were supported by analyzing of hexane flies extracts by gas chromatography. In the second MALDI-MSI project the properties of a new fixation medium based on poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (pHPMA) were studied with respect to the making and analyzing of cryo-microtome sections of *Bombus terrestris*.

Key words

Mass spectrometry, construction of a universal platform for AIT, MSI, DESI-MS, DAPPI-MS, MALDI-MS

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK	11
2	ÚVOD	15
2.1	Aplikace DESI/DAPPI-MS a MALDI-MS pro studium biologických objektů	16
3	TEORETICKÁ ČÁST	18
3.1	Desorpční ionizační techniky v MS	19
3.1.1	Desorpce a ionizace za spoluúčasti matrice	20
3.1.2	Desorpční elektrosprejová ionizace	22
3.1.2.1	Ionizační mechanismy v technice desorpční elektrosprejové ionizace	25
3.1.3	Desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku	26
3.2	Hmotnostní analyzátory	27
3.2.1	Hmotnostní analyzátor doby letu	28
3.2.2	Iontová past	29
3.2.3	Orbitrap	31
3.2.4	Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací	32
3.3	Přístupy měření vzorků v MS	33
3.3.1	Analýza diskrétních vzorků	34
3.3.1.1	Příprava vzorků pro MS analýzy	34
3.3.2	Zobrazovací hmotnostní spektrometrie	35
3.3.2.1	Příprava vzorků pro MSI	37
3.3.2.2	Kryomikrotomické řezy biologických vzorků	37
3.3.2.3	Příprava trojrozměrných biologických vzorků	38
3.3.3	Volba MALDI matrice a její nanášení na vzorky	40
3.4	Metody využívané ke stanovení melaminu v mléčných produktech	42
3.5	Lipidomický profil novorozeneckého mázku	43
3.6	Alkaloidy rostliny oměj šalamounek	43
3.7	Kutikulární lipidy a chemická komunikace much octomilek obecných	44
4	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	46
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
5.1	Konstrukce univerzální platformy pro AIT typu DESI-MS a DAPPI-MS	49
5.1.1	Přestavba manuální platformy pro AIT na motorizovanou	54
5.2	DAPPI-MS	57
5.2.1	Úprava vzorků tkání pro DAPPI-MS analýzy	57
5.2.1.1	Analýza melaminu v mléčných výrobcích	58
5.2.1.2	Analýza novorozeneckého mázku	58
5.2.2	Podmínky měření pro DAPPI-MS analýzy	59
5.3	DESI-MS	60
5.3.1	Úprava vzorků pro DESI-MS analýzy	61

5.3.1.1	Analýza modelového analytu rhodaminu B	61
5.3.1.2	Studium procesů desorpce a ionizace při DESI-MS experimentech	62
5.3.1.3	Analýza biologických vzorků rostliny oměje šalamounek	62
5.3.2	Podmínky měření pro DESI-MS analýzy	63
5.3.2.1	Podmínky měření analýzy rhodaminu B	63
5.3.2.2	Experimentální podmínky studia fundamentálních procesů v DESI-MS	64
5.3.2.3	Podmínky měření biologických vzorků rostliny oměj šalamounek	64
5.4	MALDI-MSI	65
5.4.1	MALDI desky pro vzorky much octomilek obecných	65
5.4.2	Úprava vzorků pro MALDI-MSI analýzy	67
5.4.2.1	Příprava vzorků much octomilek obecných	67
5.4.2.2	Příprava vzorků čmeláka zemního	68
5.4.3	Podmínky měření pro MALDI-MSI	69
5.4.3.1	Podmínky měření LDI/MALDI-MSI octomilek obecných	70
5.4.3.2	Podmínky měření MALDI-MSI čmeláka zemního	70
5.5	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí	71
5.5.1	Příprava vzorků pro GC/MS	71
5.5.2	Podmínky měření GC/MS	72
5.6	Software použitý pro akvizici a vyhodnocování MS dat	72
5.7	Rastrovací elektronová mikroskopie	74
5.8	Chemikálie a laboratorní pomůcky	74
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	77
6.1	Konstrukce, testování a optimalizace AIT platformy pro DESI/DAPPI-MS	78
6.1.1	Testování AIT platformy na základě DESI-MS rhodaminu B	78
6.1.2	Testování AIT platformy prostřednictvím DESI-MS rostliny oměj šalamounek	80
6.1.3	Testování AIT platformy na základě DAPPI-MS novorozeneckého mázku	82
6.2	Studium procesů desorpce/ionizace v DESI-MS	84
6.3	Analýza melaminu v mléčných výrobcích prostřednictvím DAPPI-MS	92
6.4	MALDI-MSI biologických vzorků hmyzu	100
6.4.1	MALDI-MSI much octomilek obecných	100
6.4.1.1	Přínos MALDI desek pro MSI analýzu octomilek obecných	101
6.4.1.2	Příčiny a důsledky posunu hmotností při MSI analýzách octomilek obecných	103
6.4.1.3	Nanášení matrice na intaktní jedince much octomilek obecných	105
6.4.1.4	MALDI-MSI kutikulárních lipidů octomilek obecných	106
6.4.2	GC/MS hexanových extraktů částí těl octomilek obecných	114
6.4.2.1	GC/MS hexanových extraktů samičích křídel octomilek obecných	114
6.4.2.2	GC/MS hexanových extraktů abdominálních částí octomilek obecných	115
6.4.3	MALDI-MSI čmeláka zemního	116
7	ZÁVĚR	120

8	POUŽITÁ LITERATURA	126
9	VÝTISKY PUBLIKACÍ	149

1. SEZNAM ZKRATEK

SEZNAM ZKRATEK

1-D – jednorozměrné
2-D – dvourozměrné
3-D – třírozměrné
2,3-DAP – 2,3-diaminopyridin
5-HMF – 5-hydroxymethylfurfural
7,11-HD – (Z,Z)-7,11-heptakosadien
7,11-ND – (Z,Z)-7,11-nonakosadien
AIT – ambientní ionizační technika
AP-MALDI – MALDI probíhající za atmosférického tlaku
APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku
Arb – arbitrární jednotka
CER – ceramidy
CH5O3 – 3-*O*-acetyl-1,3-dihydroxy-oktakosa-11,19-dien
CHOL – cholesterol
cVA – *cis*-vakcenyl acetát
DAPCI – desorpční chemická ionizace za atmosférického tlaku
DAPPI – desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku
DART – přímá analýza v reálném čase
DESI – desorpční elektrosprejová ionizace
DeSI – desorpčně extrakční elektrosprejová ionizace
DeSSI – desorpčně sonická sprejová ionizace
DHB – kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
DI – desorpční ionizace
DD – diestery diolů
EASI – jednoduchá ambientní sprejová ionizace
EESI – ultrazvukem asistovaná extrakční elektrosprejová ionizace
ELDI – elektrosprejová laserová desorpce/ionizace
ESI – elektrosprejová ionizace
FFA – volné mastné kyseliny

FT-ICR – iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC – plynová chromatografie
HCCA – kyselina α -kyano-4-hydroxy-*trans*-skořicová
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
VN – vysoké napětí
IT – iontová past
ITO – vodivá podložní sklíčka s vrstvou oxidů india a cínu
LAESI – laserově ablační elektrosprejová ionizace
LC – kapalinová chromatografie
LESA – kapalinově extrakční povrchová analýza
LiDHB – lithná sůl kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové
 m/z – poměr hmotnosti k náboji iontu
MALDI – laserová desorpční ionizace za spoluúčasti matrice
MALDESI – MALDI asistovaná elektrosprejová ionizace
MEL – melamin
MH – molekulová hmotnost
MS – hmotnostní spektrometr
MSI – zobrazovací hmotnostní spektrometrie
MTBE – methyl-*terc*-butyl ether (2-methoxy-2-methylpropan)
Nd-YAG – neodynem dopovaný krystal yttrium aluminum granátu
PEEK – polyetheretherketon
PEG – polyethylenglykol
pHPMA – poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid]
PL – fosfolipidy
PMMA – polymethylmetakrylát
POM – polyoxymethylen
PTFE – polytetrafluoroethylen
PVA – polyvinylalkohol
SA – kyselina sinapová
SE – sterolestery
SEM – rastrovací elektronový mikroskop
SIMS – hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

SK – sprejovací kapalina
SQ – skvalen
TFA – kyselina trifluoroctová
TGs – triacylglyceroly
TIC – celkový iontový proud
TLC – tenkovrstvá chromatografie
TNT – trinitritoluen
TOF – analyzátor doby letu
USB – univerzální sériová sběrnice
UV – ultrafialové světlo
WE – voskové estery

2. ÚVOD

2.1 Aplikace DESI/DAPPI-MS a MALDI-MS pro studium biologických objektů

Desorpčně ionizační (DI) techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) představují alternativu ke klasickým analýzám v roztoku, přičemž jejich potenciál spojený s rozvojem a rozšiřováním počtu uživatelů MS neustále roste. DI techniky představují různorodou skupinu, kterou v základu můžeme rozdělovat na techniky pracující za vysokého vakua a techniky při kterých je vzorek ionizován za atmosférického tlaku. S různorodostí ionizačních technik souvisí i vysoká variabilita analyzovaných vzorků, co do jejich typu (anorganické, organické nebo biologické vzorky) a povahy (kapalné nebo pevné vzorky). Nezávisle na zvoleném ionizačním přístupu lze vzorky analyzovat v různých typech režimů. Zejména pro studium biologických vzorků se využívá tzv. zobrazování, a to nejčastěji ve dvou rozměrech. Uvedený způsob analýzy povrchu se obecně nazývá zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI, Mass Spectrometry Imaging). Přístup MSI umožňuje získání informace o vzorku jak na úrovni chemického složení povrchu, tak i v podobě distribuce molekul sloučenin v kontextu s analyzovanou oblastí vzorku.

Předkládaná disertační práce je zaměřena na aplikační možnosti různých typů DI technik ve spojení s analýzou živočišných a rostlinných tkáňových vzorků. Vzorky byly analyzovány pomocí techniky desorpční elektrosprejové ionizace (DESI), desorpční atmosférické fotoionizace (DAPPI) a laserové desorpční ionizace za spoluúčasti matrice (MALDI).

Součástí této disertační práce byla stavba univerzální platformy pro ambientní ionizační techniky (AIT), která byla cíleně navržena pro analýzy s hmotnostními spektrometry typu Thermo Fisher Scientific (USA). Daná platforma byla využita pro výše uvedené ambientní techniky DESI a DAPPI. V případě DESI byly studovány, ve spojení s aplikací nanočástic a různých typů vzorkovacích povrchů, zejména fundamentální procesy desorpce a ionizace uplatňující se v této technice. Kromě toho bylo DESI využito také k povrchové analýze biologických vzorků rostliny oměj šalamounek. Technika DAPPI byla aplikována na analýzu mléka a smetany s cílem odhalit jejich případnou kontaminaci melaminem a stejně tak pro analýzu novorozeneckého mazu.

Přístup MALDI byl v této práci využit v režimu MSI ke studiu kutikulárních lipidů intaktních vzorků much octomilek obecných (*Drosophila melanogaster*) a dále k analýze kryomikrotomických řezů vzorků čmeláka zemního (*Bombus terrestris*) ve spojení s aplikací nového fixačního MALDI média.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Desorpční ionizační techniky v MS

Desorpční ionizační techniky využívané v MS můžeme rozdělovat podle podmínek nutných k ionizaci na techniky pracující za vakua a na techniky ambientní tj. takové, které pracují za atmosférického tlaku.

Do skupiny DI technik pracujících za vysokého vakua řadíme dvě nejrozšířenější a nejdéle využívané desorpční techniky, kterými jsou MALDI [1,2] a hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (SIMS) [3,4,5,6]. V případě MS analýz biologických vzorků je však nejčastěji využíváno techniky MALDI, a to hned z několika důvodů. Hlavním důvodem je skutečnost, že MALDI je poměrně značně rozšířená desorpčně-ionizační technika v biologicky orientované MS komunitě, čímž je zajištěna její dostupnost pro analýzu biologických objektů. Technika MALDI je také uživatelsky i finančně daleko přístupnější a méně náročná ve srovnání se SIMS. V neposlední řadě umožňuje MALDI na rozdíl od SIMS analyzovat proteiny. Na druhou stranu za nevýhody MALDI můžeme považovat změny vlastností povrchů vzorků po aplikaci matrice anebo nižší prostorové rozlišení v porovnání se SIMS. SIMS jako jediná komerční DI technika dosahuje pracovního prostorového rozlišení na sub-mikrometrické úrovni. Kromě výše uvedeného je MALDI pro studium biologických vzorků zvýhodněna i faktem, že aplikace SIMS je z historického hlediska orientovaná především do fyzikální oblasti, čímž je proces jejího využití a přímého vstupu do biologického prostředí významně ztížen.

Mezi DI techniky pracující za atmosférického tlaku, které se uplatňují v MS analýzách biologických vzorků, řadíme především DESI, která byla publikována v roce 2004 [7] a která zahájila etapu a rozmach AIT. Hlavní přínos v podobě DESI a obecně AIT spočíval v možnosti přímé MS analýzy nativních vzorků nevyžadujících jakoukoliv úpravu, což bylo v kontextu s do té doby používanými DI pracujícími za vakua neproveditelné. Kromě toho při DESI pracujícího bez vakua nedocházelo na rozdíl od MALDI ke ztrátám volatilních látek z povrchu vzorku. Díky tomu byl výsledek analýzy bližší reálnému zastoupení látek na povrchu.

V následujících letech po publikování DESI došlo k výraznému rozvoji AIT [8] založených na různých způsobech ionizace vzorku. Byla publikována řada nových AIT, o kterých lze říci, že využívají principu elektrospreje (ESI) [9], a mezi které můžeme řadit např. elektrosprejovou laserovou desorpci/ionizaci (ELDI) [10], MALDI

asistovanou elektrosprejovou ionizací (MALDESI) [11], desorpční sonickou sprejovou ionizací (DeSSI) [12] nebo laserově ablační elektrosprejovou ionizací (LAESI) [13]. Podobným způsobem můžeme vytvořit skupinu AIT odvozených od přístupu chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [14,15], do které lze zahrnout např. technika přímé analýzy v reálném čase (DART) [16], desorpční chemická ionizace za atmosférického tlaku (DAPCI) [17] nebo DAPPI [18].

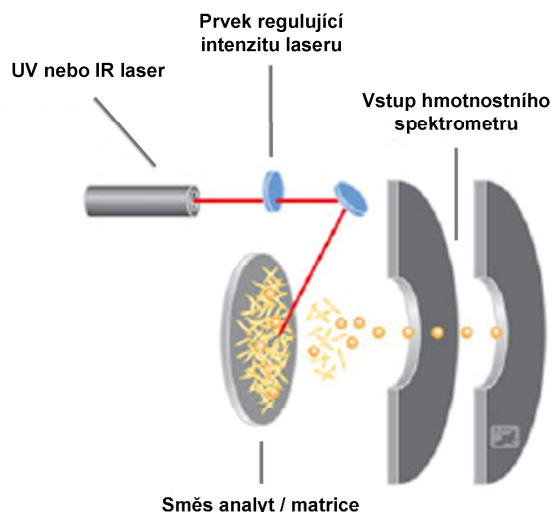
Co se týče MSI experimentů s biologickými vzorky v kontextu s použitím některé AIT, lze konstatovat, že teoreticky je možné pro zobrazování použít jakoukoliv AIT, ovšem s velkou amplitudou kvality získaných dat. Z AIT se v současné době pro MSI využívá nejčastěji DESI, LAESI, LESA [19] nebo např. AP-MALDI [20]. Nárůst aplikací a obecný trend používání AIT je značný, ovšem v globálním měřítku zůstává MALDI nadále mezi nejrozšířenější DI techniky pro MS/MSI experimenty s biologickými vzorky.

3.1.1 Desorpce a ionizace za spoluúčasti matrice

Desorpční ionizace laserem za spoluúčasti matrice (MALDI) je měkká ionizační technika pracující za vysokého vakua, která je v hmotnostní spektrometrii díky svým vlastnostem široce využívána. Termín MALDI byl poprvé použit v roce 1985 v publikaci Karas *et al.* [1] nicméně za první stěžejní práce zabývající se MALDI a využívající organické resp. anorganické matrice se považují publikace z roku 1988 od Karas *et al.* [2] a Tanaka *et al.* [21].

V rámci MALDI jsou analyzované látky desorpčně ionizovány z povrchu za přítomnosti matrice (Obr. 3.1). Molekuly analytu jsou tak v případě MALDI ionizovány nepřímo, a to prostřednictvím matrice, která je vůči analytu v nadbytku a primárně absorbuje energii laserového pulsu o dané vlnové délce. Předpokládá se tedy, že proces ionizace analytu probíhá zejména v plynné fázi [2], v které jsou následně takto vzniklé ionty, převážně jednou nabitě a často ve formě aduktů s alkalickými kovy popř. maticí [22], směřovány do hmotnostního analyzátoru. Pomocí MALDI lze analyzovat stejně tak malé organické molekuly (< 1000 Da) jako i velké proteiny (> 100 kDa). Vzhledem k pulzní povaze MALDI je výhodné pracovat s výkonným hmotnostním analyzátozem jako je analyzátor doby letu (TOF), který se v kombinaci

s MALDI používá nejčastěji [23]. Ještě výhodnější je potom uspořádání MALDI-TOF/TOF umožňující fragmentaci vybraných iontů [24] nebo v ideálním případě spojení MALDI s iontově cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací (FT-ICR), která poskytuje vysoké rozlišení [25].



Obr. 3.1 Obecné schéma MALDI ionizačního zdroje [26].

Nejčastěji používané lasery pro MALDI jsou dusíkový laser (337 nm) a Nd-YAG (266 nm nebo 355 nm). Vlnová délka laseru, ale především energie laseru vztahovaná na plochu je významným parametrem, který ovlivňuje proces desorpce a ionizace [26,27].

Způsob aplikace matrice na vzorek úzce souvisí se záměrem experimentu a stejně tak s charakterem samotného vzorku. Nejčastěji je rozpuštěný vzorek pipetou nanášen na MALDI desku, kde je po odpaření rozpouštědla převrstvený roztokem matrice. Stejně tak je možné nanášet vzorek v roztoku, ve kterém je již příslušné množství matrice rozpuštěno. V případě biologických vzorků v podobě rostlinných nebo živočišných tkání se uplatňuje jiný postup, a to sprejování matrice v roztoku [28] nebo nanášení matrice pomocí speciálního zařízení pracujícího na principu kontrolovaného oscilačního odpařování matrice [29]. K nanášení některých matric na vzorek lze využít také jejich sublimace [30]. Běžně používanými matricemi na bázi organických aromatických kyselin jsou například kyselina 2,5-dihydroxybenzoová

(DHB), kyselina sinapová (SA) nebo kyselina α -kyano-4-hydroxy-*trans*-skořicová (HCCA). Použití jednotlivých matric přitom koresponduje s charakterem studovaných analytů.

MALDI-MSI je metoda široce využívaná ke 2-D analýze biologických [31,32,33] i jiných povrchů za účelem studia distribuce sledovaných analytů jako například lipidů [34,35,36,37], peptidů a proteinů [38,39,40] nebo léčiv a metabolitů [41,42,43]. Nejčastěji je vzorek analyzovaný s rozlišením v rozmezí 10 - 100 μm , což je optimální rozlišení poskytující ve většině případů dostatečnou informaci o distribuci látek na povrchu vzorku i s ohledem na faktor časové náročnosti akvizice dat, která se lineárně zvyšuje s rostoucím rozlišením.

Kromě standardního uspořádání MALDI, které pracuje v prostředí vysokého vakua, existuje i ambientní verze této ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (AP-MALDI) [44]. V porovnání s MALDI lze říci, že je AP-MALDI měkčí technikou, díky čemuž je ve spektrech také méně fragmentovaných iontů [45].

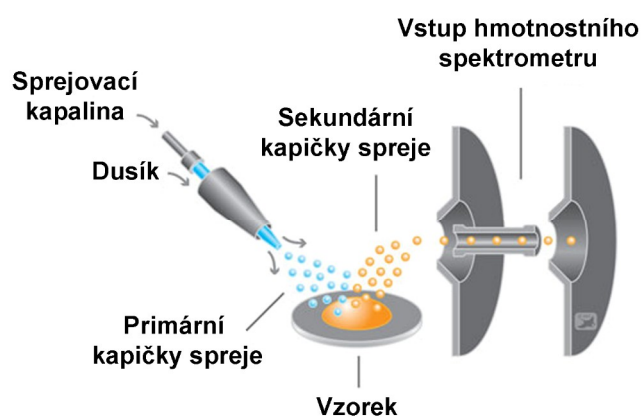
3.1.2 Desorpční elektrosprejová ionizace

Desorpční elektrosprejová ionizace (DESI) je ambientní ionizační technikou, která byla popsána v roce 2004 a za jejímž objevením stojí R. G. Cooks [46,47]. DESI je průnikem technik ESI [48] a desorpční ionizace [49]. Na rozdíl od DI, je však možné s DESI pracovat za atmosférického tlaku, a to nejen s pevnými vzorky, ale i s kapalnými popř. plynnými vzorky adsorbovanými na vhodném sorbentu. DESI umožňuje kromě analýzy polárních analytů, a to v širokém rozpětí molekulových hmotností od malých organických molekul po středně velké proteiny, získávat hmotnostní spektra i z nepolárních látek (karoten, TNT aj.), které jsou v rámci ESI neionizovatelné [46,47]. Další výhodou DESI spočívá v možnosti vynechání úprav vzorků předcházejících vlastní analýzu. Technika tak není limitována zpravidla časově náročnou chromatografickou separací. Příprava vzorku pro DESI nevyžaduje ani přítomnost pomocné matrice jako v případě MALDI, a tím také nedochází k interferenci analytu s matricí a je možné pracovat v oblasti nízkých hmotností [46,47].

Mechanismus a doprovodné jevy vztahující se k desorpci a ionizaci analytu v rámci DESI nejsou doposud uspokojivě a komplexně objasněny, a to i přes řadu

provedených počítačových simulací a experimentálních studií [50,51]. Pochopení těchto složitých procesů je středem zájmu současného výzkumu. Na základě jedné z nejpravděpodobnějších teorií tzv. „Droplet pick up“ mechanismu [47] je při DESI experimentu vzorek rozpuštěný nabitými primárními kapičkami sprejovací kapaliny (SK), jejichž tvorba je obdobná jako v případě ESI [52,53], čímž dochází k předání náboje mezi ionizovanými molekulami SK a analytem. Vznikají tak sekundární kapičky obsahující ionizovaný analyt, které jsou proudem dusíku vytrženy z povrchu vzorku resp. vzorkovací destičky a nasměrovány do inletu MS [47,50]. Vzhledem k výše uvedené skutečnosti je podmínkou úspěšného DESI experimentu rozpustnost analytu ve sprejovací kapalině [47].

V DESI spektrech jsou zastoupeny především mnohonásobně nabitě ionty analytů a adukty iontů s alkalickými kovy jako např. $[M+Na]^+$ nebo $[M+K]^+$. Spektra je možné měřit v pozitivním i negativním režimu za účelem kvalitativní i kvantitativní analýzy. Díky dostatečně stabilnímu signálu je pomocí DESI také možné měřit fragmentační spektra. Limity detekce analytu se pro DESI pohybují v řádech pikogramů až femtogramů [47,54]. Matriční efekty pozorované při analýzách vzorků rostlinných a živočišných tkání popř. jiných komplexních vzorků je možné potlačovat pomocí vhodně zvoleného složení mobilní fáze, čímž dochází k selektivní ionizaci zamýšlených látek [46,55].



Obr. 3.2 Obecné schéma iontového zdroje DESI [26].

DESI instrumentace (Obr. 3.2) je obecně složena ze sprejovacího zařízení, které je upnuto do komponenty zajišťující jeho polohování, kterou nazýváme manipulátor sprejeru. Další hlavní částí instrumentace je vzorkovací stolek, který slouží k nastavení vhodné prostorové orientace analyzovaného vzorku naneseného na vybraném typu vzorkovacího povrchu. Vzorkovací stolek je stejně jako manipulátor sprejeru situovaný na kovovém bloku nebo na ocelových lyžinách z něj vycházejících, které jsou upevněny přímo na hmotnostní spektrometr, a to v oblasti atmosférického inletu tj. vstupní kapiláry přístroje.

Manipulátor umožňuje 3-D nastavení sprejeru. Samotné tělo sprejeru je v obecném pojetí složené z ocelové kapiláry, na jejímž konci dochází za spoluúčasti dusíku jako nebulizačního plynu k elektrosprejování SK, která je do sprejeru přiváděna křemennou kapilárou. Na ocelovou resp. koaxiálně vedenou křemennou kapiláru je vkládáno vysoké napětí (3-6 kV), které je regulováno, stejně jako průtok dusíku popř. i průtok mobilní fáze, prostřednictvím uživatelského rozhraní hmotnostního spektrometru [46,47].

Mezi hlavní parametry podílející se na úspěšnosti a efektivitě desorpce a ionizace, patří v kontextu s výše napsaným právě zmíněný průtok a složení mobilní fáze, průtok nebulizačního plynu a vzdálenost a úhel, pod kterým dopadají primární kapičky spreje mobilní fáze a pod kterým vstupují sekundární kapičky do inletu MS. Desorpci lze dále ovlivňovat velikostí vloženého napětí na sprejovací kapiláru a obecně parametry sprejeru. V případě kapalných vzorků jsou jedním z hlavních kritérií úspěšnosti desorpce vlastnosti povrchu, na kterém je vzorek nanesený. Vzorkovací destičky proto představují širokou materiálovou skupinu. Mezi standardní a nejčastěji používané patří sklo a polymerové povrchy jako například teflon (PTFE) nebo organické sklo (PMMA) [56]. Kromě toho lze používat klasické desky tenkovrstvé chromatografie (TLC) [54], speciální typy porézního papíru [57], silikonové plátky a jiné materiály. Na základě DESI lze získat relevantní hmotnostní spektra dokonce i z různých druhů tkanin, kůže, ale i z povrchů ovoce či zeleniny [47].

DESI instrumentaci je možné řešit jako manuální nebo motorizovanou. V případě manuálního uspořádání je posun vzorkovacího stolku resp. vzorku vůči sprejeru ovládán samotným operátorem tj. obsluhou DESI zdroje. Naopak motorizovaný DESI zdroj umožňuje jednotlivé ovládací prvky řídit počítačem a

nastavovat je prostřednictvím softwaru a jeho uživatelského rozhraní. Motorizovanou DESI instrumentaci je tak možné díky definovanému krokování posunu vzorku využívat k přesnému 2-D prostorovému zobrazování (DESI-MSI), které se využívá zejména v případě studia různých biologických vzorků [46,58,59,60]. Značnou nevýhodou DESI vůči ostatním technikám používaných v MSI (MALDI nebo SIMS) však zůstává její nízké rozlišení, které se většinou pohybuje pouze v řádech stovek mikrometrů a nemůže tak konkurovat běžnému rozlišení desítek mikrometrů v případě MALDI nebo sub-mikrometrickému rozlišení v případě techniky SIMS.

3.1.2.1 Ionizační mechanismy v technice desorpční elektrosprejové ionizace

Problematika základních ionizačních procesů uplatňujících se v DESI-MS byla studována, jak na úrovni počítačových simulací tak experimentálním přístupem [61].

Na základě experimentálně potvrzených závěrů počítačových simulací zaměřených na kolizi kapiček DESI spreje se vzorkovacím povrchem (hovoříme o tzv. „Droplet pick up“ mechanismu [62,63]), byla potvrzena existence tenkého filmu rozpouštědla vznikajícího na povrchu z primárních kapiček SK. V souladu s výše uvedeným mechanismem potom byly z takto definovaného povrchu pomocí dalších dopadajících kapiček SK do okolí vystřelovány tzv. sekundární kapičky, které již obsahovaly sledovaný analyt a které podstupovaly standardní ESI ionizační mechanismus.

Desorpčně ionizační procesy v DESI-MS byly studovány i přes všeobecně respektovaný výklad „Droplet pick up“ mechanismu. Byly tak provedeny experimenty například s pomocí fázového Dopplerova analyzátoru [64] týkající se velikosti, chování a rychlosti kapiček spreje modelového DESI zdroje. V rámci objasnění mechanismů v DESI byly také studovány vlivy elektrostatického pole vyskytujícího se na komponentech ionizačního zdroje, dále vliv vnějšího elektrického pole pocházejícího z vloženého napětí na DESI sprejer [64,65] a stejně tak elektrochemické a elektrické faktory v souvislosti s různými druhy vzorkovacích povrchů [66], které by mohly mít vliv na efektivitu a kvalitu desorpčně ionizačního procesu v DESI. Další oblast studia byla soustředěná na oxidačně-redukční reakce. Na základě rozličných studií však

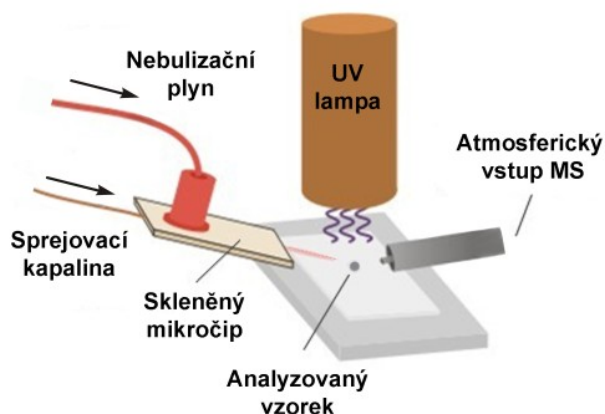
nebylo prokázáno, že by oxidace a redukce, které byly pozorovány, byly přímým důsledkem elektrochemických procesů uplatňujících se v DESI [51,67,68].

Při studiu desorpčně ionizačních procesů byla také (pomocí fluorescenční detekce) zjištěna přítomnost povrchových struktur vznikajících v průběhu DESI experimentu z analytu aplikovaného na vzorkovacím povrchu [69].

3.1.3 Desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku

Desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku je ambientní ionizační technikou, která byla poprvé popsána v publikaci Haapala *et al.* [70] v roce 2007. DAPPI je analogická technice označované jako fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [71], ovšem s tím rozdílem, že DAPPI umožňuje provádět přímou analýzu pevných vzorků. V případě DAPPI analýzy kapalných vzorků je jediným krokem jejich přípravy nanesení vzorků na vhodný typ vzorkovacího povrchu a následné odpaření rozpouštědla. Odpařování může probíhat za laboratorní teploty nebo v případě termostabilních látek zahříváním.

Technika DAPPI umožňuje efektivně ionizovat především nepolární a neutrální látky, ale v menší míře také látky polární a jako taková byla využita k analýze různých druhů a lékových forem léčiv [72,73] nebo lipidů [74]. Principem DAPPI (Obr. 3.3) je proces desorpční fotoionizace, který byl podrobně popsán a studován v publikaci Luosujarvi *et al.* [75]. Na vzorek nanesený na vzorkovací povrch je nasměrován proud zplyněné SK (300 – 400 °C), kterou je nejčastěji toluen nebo aceton, ve směsi s dusíkem jako nebulizačním plynem. Ke zplynění SK dochází v odporově vyhřívaném skleněném mikročipu [70], který je zpravidla upnutý do manipulátoru umožňujícího prostřednictvím mikrometrických šroubů jeho 3-D polohování. Teplota skleněného mikročipu je regulována prostřednictvím externího zdroje a nastavována na pracovní hodnotu přibližně 320 °C, což odpovídá elektrickému výkonu zdroje při hodnotě 4,2 W [76].



Obr. 3.3 Obecné schéma DAPPI ionizačního zdroje [70].

Horký proud SK dopadá na vzorek, čímž dochází k jeho termální desorpci. Z toho důvodu je vhodné nanášet vzorek na vzorkovací povrch s nízkou tepelnou vodivostí. Oblak desorbovaných molekul analytu je následně fotoionizován pomocí UV lampy a směřován do atmosférického vstupu hmotnostního spektrometru [75]. K zajištění dostatečné výtěžnosti ionizace analytu v plynné fázi je obecně nutné umístit UV lampu co nejblíže k místu dopadajícího paprsku spreje SK na vzorek.

Vzhledem k procesu termální desorpce, který se v DAPPI uplatňuje, dochází v případě analýzy nestabilních a velkých molekul sloučenin k jejich fragmentaci. Limity detekce se v případě DAPPI pohybují v rozmezí od desítek do stovek femtomolů [70].

3.2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor je nedílná součást hmotnostního spektrometru a slouží k separaci iontů a k jejich následnému rozlišení podle poměru m/z (hmotnost/náboj).

V následujícím textu budou popsány rozdílné principy určování hodnoty m/z u čtyřech typů hmotnostních analyzátorů použitých při vypracovávání této práce. Jmenovitě se jedná o hmotnostní analyzátor doby letu, Orbitrap, iontovou past a iontovou cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací.

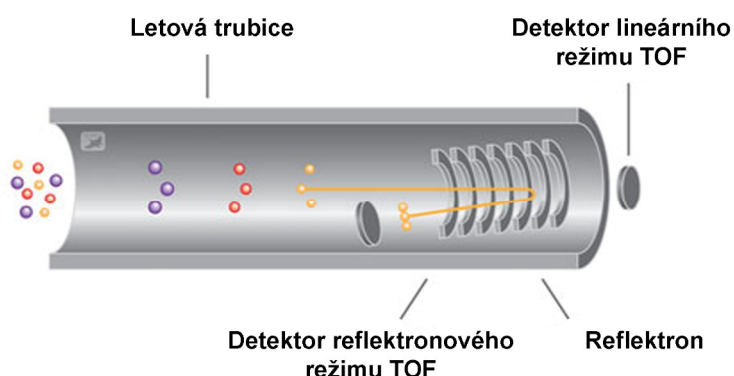
3.2.1 Hmotnostní analyzátor doby letu

Hmotnostní analyzátor doby letu (TOF), jehož princip detekce byl publikován již v roce 1946 [77], separuje ionty na základě času, který uběhne během letu příslušných fragmentů z iontového zdroje k detektoru. Všechny ionty jsou přitom urychleny akceleračním pulsem (15 – 25 kV), čímž skupiny iontů o stejném náboji získávají shodnou kinetickou energii. Princip dělení iontů se tak odvíjí od toho, že rychlost jejich pohybu závisí na poměru m/z . Z toho vyplývá, že částice se shodným nábojem a s nižší hmotností mají vyšší rychlost na rozdíl od částic s větší hmotností, které se v letové trubici pohybují navzdory shodné kinetické energii a náboji pomaleji. Díky tomu je iont s nižší hmotností detekován rychleji.

Závislost hodnoty m/z iontu na jeho čase stráveném v letové trubici lze vyjádřit rovnicí:

$$m/z = 2E_k(t/l)^2$$

kde m je hmotnost a z náboj daného iontu, E_k je akcelerační potenciál, t je čas dopadu iontu na detektor a l je délka letové trubice. TOF analyzátor může být uspořádán kromě základního lineárního módu také v režimu reflektroновém viz Obr. 3.4. V případě reflektroновého módu je pomocí iontové optiky tj. reflektroну zvyšováno rozlišení a přesnost určení hmotnosti. TOF analyzátor tak poskytuje rozlišení až více než 40000 s přesností méně než 1 ppm při zachování vysoké citlivosti na úrovni fmol [78]. Kromě reflektroну lze zlepšit parametry TOF pomocí zpožděné extrakce iontů [79].



Obr. 3.4 Obecné schéma hmotnostního analyzátoru TOF [26].

Obecně je hlavní výhodou TOF analyzátoru jeho teoreticky neomezený hmotnostní rozsah a dále velice rychlá detekce všech iontů (nedochází ke skenování) odstupňovaná v krátkých časových intervalech, čímž lze získat úplné spektrum v rámci jednoho ionizačního pulsu. Nevýhody TOF analyzátoru, kromě nemožnosti fragmentace iontů, spočívají, a to zejména v případě reflekttronového módu, v nutnosti pracovat za vysokého vakua ($<10^{-6}$ torr), dále v jeho nekompatibilitě s kontinuálními ionizačními zdroji typu ESI a v neposlední řadě v požadavcích analyzátoru na vysoký výkon detektoru a podpůrné elektroniky.

TOF analyzátor tak poskytuje velmi rychlou analýzu a je ze své povahy vhodný zejména pro spojení s MALDI tedy pulzním iontovým zdrojem.

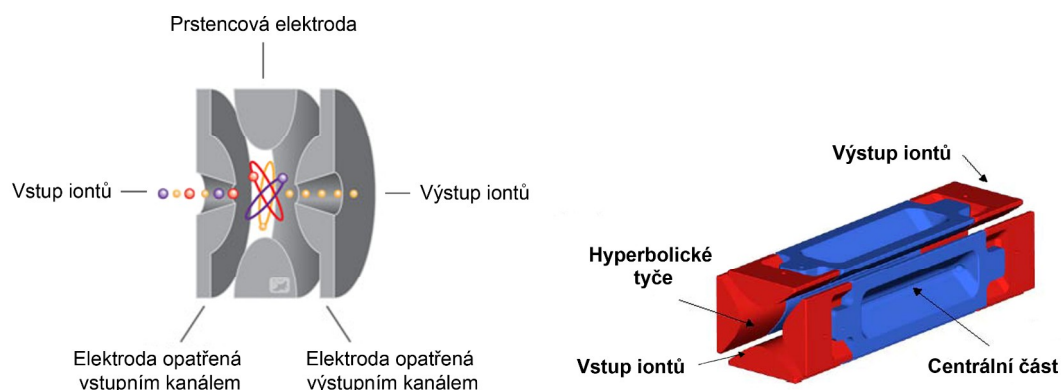
3.2.2 Iontová past

Hmotnostní analyzátor s označením iontová past (IT) pracuje na obdobném principu jako kvadrupólový filtr [80] tj. využívá rozdílné stability trajektorie iontů v oscilujícím elektrickém poli. V hmotnostní spektrometrii se využívá dvou typů iontových pastí, a to ve 2-D provedení, jejíž nejstarší konstrukční řešení pochází z roku 1969 [81] a historicky novější 3-D provedení z roku 1988 [82,83].

2-D iontová past známá také pod označením lineární iontová past byla v rámci hmotnostní spektrometrie poprvé prakticky využita jako kolizní cela trojitého kvadrupólu v publikaci Dolnikowski *et al.* [84]. Ve své podstatě je lineární IT kvadrupólem opatřeným na obou koncích elektrodami, na které je vkládáno stejnosměrné napětí na rozdíl od centrální části IT, která je tvořena tyčemi s hyperbolickým průřezem s vloženým střídavým napětím [85,86].

Konstrukce 3-D neboli sférické IT viz Obr. 3.5 je založena na trojici elektrod, z nichž jedna je kruhová a dvě vyklenuté do vnitřního prostoru, který elektrody vytvářejí. Ionty jsou do prostoru IT přiváděny pulzně přes vstupní otvor na základě nastavení vhodného poměru napětí na elektrodách. Účinnost záchytu iontů se přitom pohybuje kolem 5 %. Stejným způsobem jsou ionty po separaci na základě poměru m/z z 3-D IT vypuzovány výstupním otvorem směrem k detektoru. 3-D IT je vyplněna heliem, který plní funkci tlumícího plynu a který je v pasti udržován při nízkém tlaku (10^{-3} Pa). Helium v IT snižuje kinetickou energii iontů resp. oscilaci v ose z , díky

čemuž dochází k jejich zhlukování. Tlumicí plyn tak zvyšuje rozlišovací schopnosti i efektivitu záchytu iontů v IT [87].



Obr. 3.5 Obecné schéma 3-D [26] a 2-D [87] iontové pasti.

Hlavním parametrem, v kterém se od sebe liší 2-D a 3-D IT je efektivita záchytu, v ionizačním zdroji vzniklých, iontů. V případě 3-D IT se efektivita záchytu pohybuje pouze kolem 5 % [87], a to z toho důvodu, že ionty při vstupu do IT musí překonávat silné radiofrekvenční pole (RF), což má za důsledek také diskriminaci iontů v závislosti na jejich m/z . Situace kolem efektivit záchytu je zcela opačná v případě 2-D IT, kde je RF pole ve směru letu iontů, díky čemuž je teoreticky možné dosahovat až 100 % záchytu bez diskriminace m/z [84]. Lineární iontové pasti mají také obecně vyšší citlivost, dynamický rozsah a rozlišení ve srovnání s 3-D IT a zároveň je možné je kombinovat s dalšími analyzátory [85]. Skenovací rychlost lineárních IT se pohybuje kolem 27000 u/s, m/z rozsah do 20000 a rozlišení až 30000 s možností získání fragmentačních spekter do MS^{10} [88].

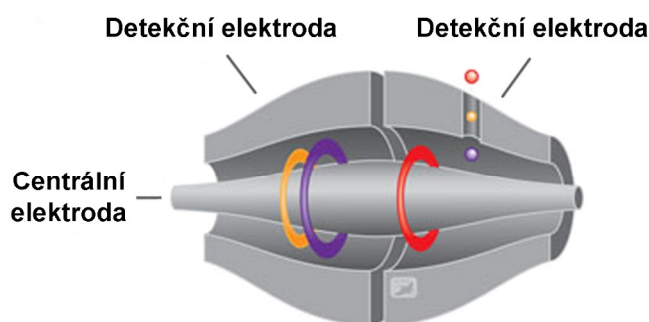
Obecné nebezpečí v případě IT analyzátorů spočívá v jejich přeplnění, které může vést ke vzniku tzv. prostorového náboje. Z toho důvodu musí být dávkování iontů do pasti striktně regulováno. Přímé důsledky prostorového náboje spočívají ve zhoršení rozlišení a citlivosti. Prostorový náboj negativně ovlivňuje harmonický pohyb iontů, díky čemuž rezonance iontů pro každou hodnotu m/z odpovídají širšímu rozsahu příslušných frekvencí.

3.2.3 Orbitrap

Orbitrap je ve své podstatě modifikací elektrostatické orbitální pasti popsané v publikaci z roku 1923 [89]. Autorem konceptu hmotnostního analyzátoru Orbitrap, který byl poprvé představen odborné veřejnosti v publikaci z roku 2000 [90] je Alexander Makarov. Orbitrap viz Obr. 3.6 je složený z vnější a vnitřní axiálně umístěné centrální elektrody, mezi které je vloženo stejnosměrné a střídavé napětí. Ionty generované nejčastěji API iontovými zdroji jsou do Orbitrapu přiváděny kolmo vzhledem k centrální elektrodě. Díky vloženým potenciálům dochází k současné oscilaci iontů nejen kolem této centrální elektrody, ale také podél ní tj. v ose z . Hodnota m/z je potom úměrná právě frekvenci oscilace iontů ve směru osy z :

$$f_z \propto 1/\sqrt{m/z}$$

Oscilace, které jsou snímány vnějšími detekčními elektrodami, představují superpozici signálů všech iontů přítomných v Orbitrapu. Teprve pomocí Fourierovy transformace je možné z naměřených frekvencí získat hmotnostní spektra. Vzhledem k vysoké přesnosti měření oscilačních frekvencí lze pomocí Orbitrapu měřit hmotnostní spektra s vysokým rozlišením.



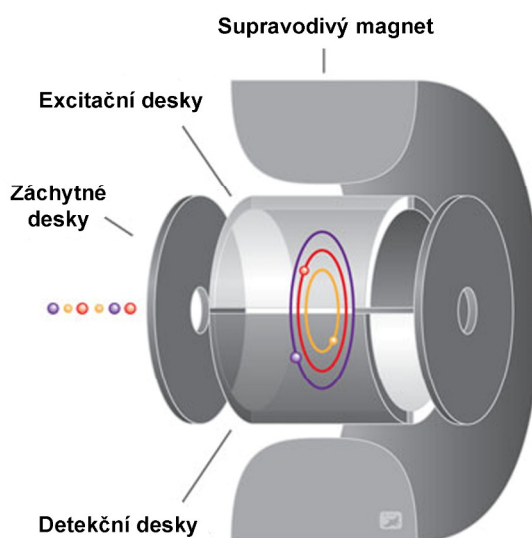
Obr. 3.6 Obecné schéma hmotnostního analyzátoru Orbitrap [26].

Komerčně dostupné hmotnostní spektrometry jsou kromě Orbitrapu vybaveny ještě druhým hmotnostním analyzátozem, kterým bývá nejčastěji lineární 2-D iontová past nebo kvadrupólový analyzátor sloužící k MS^n experimentům. V takovémto

uspořádání potom hovoříme o hybridních hmotnostních spektrometrech. Obecné parametry těchto hybridních MS dosahují v oblasti rozlišení až 450000, s přesností m/z 1-3 ppm a rozsahem m/z až 6000. Orbitrap také poskytuje velkou kapacitu a dynamický rozsah [91].

3.2.4 Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Princip hmotnostního analyzátoru FT-ICR je založen na pohybu iontů v homogenním magnetickém poli, ke kterému dochází v ICR cele při vysokém vakuu ($10^{-10} - 10^{-11}$ mbar), teplotě blízké absolutní nule a za indukce střídavého proudu [92]. ICR cela je umístěna uvnitř homogenního supravodivého magnetu s vysokým statickým magnetickým polem (až 25 T) [93], který je chlazen prostřednictvím kapalného hélia a dusíku. Samotná ICR cela je ve své podstatě elektromagnetickou iontovou pastí viz Obr. 3.7. Ionty vzniklé v iontovém zdroji jsou vedeny do MS, kde jsou pomocí iontové optiky resp. vodičů iontů separovány popř. fragmentovány a následně pulzně vedeny do ICR cely. V ICR cele dochází k opětovné separaci a fragmentaci vybraných iontů a k jejich finální analýze.



Obr. 3.7 Obecné schéma hmotnostního analyzátoru FT-ICR [26].

Cyklotronovou frekvenci iontu f_c (Hz) ve statickém magnetickém poli ICR cely lze vyjádřit pomocí následující rovnice:

$$f_c = zqB/2\pi m \text{ resp. } m/z = qB/2\pi f_c$$

kde zq (C, z – počet nábojů) odpovídá náboji iontu, B (T) je magnetická indukce a m (kg) je hmotnost analyzovaného iontu. Z toho vyplývá, že cyklotronová frekvence iontu, která je měřená detekčními elektrodami ICR cely, je nepřímo úměrná jeho hodnotě m/z . Ionty jsou tedy v cele děleny a analyzovány na základě odlišných frekvencí pohybu, které jsou charakteristické pro každou hodnotu m/z . Změřením cyklotronových frekvencí pro všechny m/z v daném hmotnostním rozsahu získáme komplexní spektrum všech detegovaných frekvencí proti času tj. tzv. konvoluované frekvenční spektrum. Dekonvolucí tohoto spektra prostřednictvím aplikace Fourierovy transformace (FT) získáme spektrum intenzit vůči dekonvoluovaným frekvencím, které je následně transformováno na klasické hmotnostní spektrum intenzit proti hodnotám m/z .

Technika FT-ICR s vysokým rozlišením umožňuje měřit hodnotu m/z s vysokou přesností (až pod 1 ppm). Určitou kompenzací za tyto výjimečné vlastnosti FT-ICR hmotnostního analyzátoru je potom relativně delší doba skenu vzhledem k porovnání s ostatními typy analyzátorů.

3.3 Přístupy měření vzorků v MS

V rámci desorpčně ionizačních technik hmotnostní spektrometrie lze analyzovat vzorky prostřednictvím dvou základních přístupů. Prvním z nich je analýza diskrétních vzorků, zatímco druhým, zcela opačným přístupem, je tzv. zobrazování, kdy je plocha odpovídající danému vzorku systematicky analyzována bod po bodu. Výsledkem takového experimentu je potom určitá mapa distribuce všech látek obsažených na povrchu daného vzorku, zohledňující jejich homogenní resp. heterogenní zastoupení.

3.3.1 Analýza diskretních vzorků

Analýza diskretních neboli jednotlivých vzorků je standardním přístupem uplatňujícím se ve spojení s DI technikami.

Jako diskretní vzorky můžeme chápat například jednotlivé frakce získané při chromatografické separaci nebo extrakty biologického materiálu atp. Stejně tak však mohou být diskretními vzorky i živočišné nebo rostlinné tkáně. V závislosti na experimentálním uspořádání a podmínkách analýzy odvíjejících se od použité DI techniky se liší i příprava samotných vzorků.

3.3.1.1 Příprava vzorků pro MS analýzy

V obecné rovině lze říci, že kvalita a správnost procesu přípravy vzorků pro MS experimenty je důležitým krokem podmiňující úspěšnost, reprodukovatelnost a další parametry samotné analýzy.

Poměrně specifický přístup v rámci přípravy diskretních vzorků představuje DI technika MALDI. V rámci této techniky jsou vzorky nanášeny na povrch ocelových, plastových popř. skleněných destiček, na kterých jsou vyznačeny a přesně definovány pozice pro jednotlivé vzorky. Vzhledem k tomu, že je při analýzách vzorků pomocí MALDI využíváno matrice, tak bylo vypracováno několik postupů, v jakém pořadí a jak na destičku vzorek (rozpuštěný ve vhodném dostatečně volatilním rozpouštědle) a matici nanášet. Využívat lze přitom například elektrospreje a sublimace [94] nebo různých postupů převrstvování matrice vzorkem [95], míšení matrice se vzorkem a následnou aplikaci roztoku na desku [96] a jiné metody. Cílem jednotlivých metod je především zajištění vysoké reprodukovatelnosti homogenity krystalizace matrice s analytem a vhodnou distribuci krystalů napříč definovanou oblastí vzorku (terčem) na MALDI destičce. Volba samotné matrice se potom odvíjí od charakteru daného vzorku [94,97,98,99].

Nanášení jednotlivých vzorků na vzorkovací destičky se uplatňuje i v případě AIT ovšem s tím rozdílem, že je možné využívat širší materiálové základny, na rozdíl od MALDI. Pro AIT se tak s výhodou používá teflon, porézní teflon, sklo a různé jeho modifikace s upraveným povrchem, TLC desky, PMMA a jiné materiály [47]. Volba

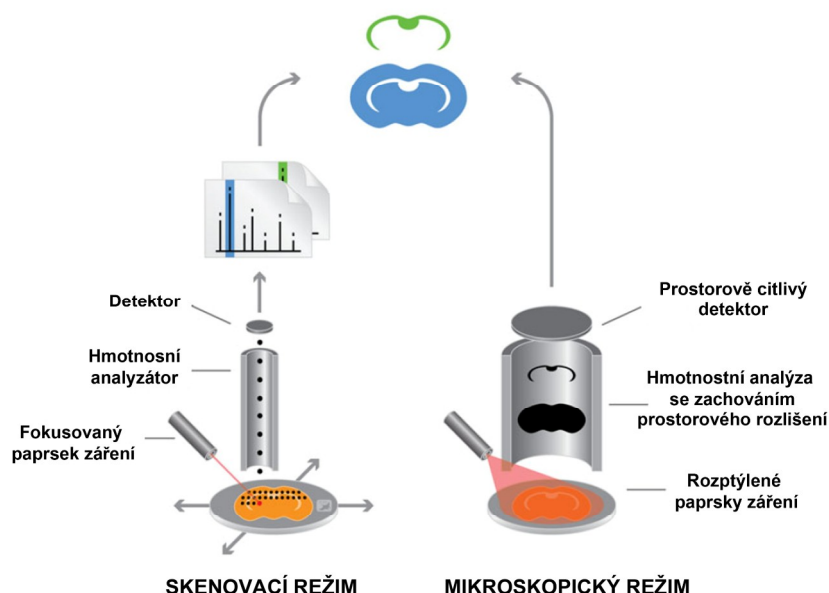
vzorkovacího materiálu souvisí s charakterem (vlastnosti sprejovací kapaliny atp.) a principem zvolené desorpční AIT. Samotný vzorek se potom nanáší, v případě kapalných vzorků, pipetou na zvolený povrch nebo se na desku fixuje, v případě pevných vzorků, pomocí oboustranné lepicí pásky nebo jiného média.

3.3.2 Zobrazovací hmotnostní spektrometrie

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI) [100] je relativně nová zobrazovací metoda, která díky svým výhodným vlastnostem nachází široké uplatnění při analýzách různých typů povrchů. Jednou z častých aplikací je dvourozměrné (2-D) zobrazování biologických vzorků [101,23].

Přístup MSI je analytickým nástrojem, který umožňuje získávat informace o distribuci sledovaných analytů, bez nutnosti jejich jakéhokoliv značení, napříč celým zobrazovaným povrchem. MSI tak poskytuje kromě informace o chemickém složení povrchu, na základě naměřených hmotnostních spekter, také prostorovou distribuci analytů, kterou je možné prostřednictvím vhodného softwaru vizualizovat.

MSI může být principiálně založena na dvou různých přístupech (Obr. 3.8) a tím pracovat ve skenovacím nebo mikroskopickém režimu [26,102].



Obr. 3.8 Obecné schéma skenovacího a mikroskopického režimu MSI [26].

V případě skenovacího módu je daný vzorek resp. povrch postupně analyzován fokusovanými primárními částicemi, v případě laseru fotony, iontového zdroje, díky čemuž dochází k desorpci a ionizaci molekul vzorku v bodech předem zvoleného rastru tedy v bodech vztažených k definovanému prostorovému rozlišení v osách x a y . Ionizované molekuly vstupují do hmotnostního analyzátoru, kde jsou analyzovány na základě poměru m/z . Výstupem analýzy je potom hmotnostní spektrum doplněné informací o absolutní pozici analyzovaného bodu v rámci celého vzorku. Z takto získaných bodů je možné prostřednictvím vhodného softwaru vytvořit obraz distribuce zvolené hodnoty m/z . V souvislosti s tím je pro MSI experimenty resp. získaná data významným parametrem prostorové rozlišení analýzy, které se odvíjí od použitého typu iontového zdroje a které je tak limitováno profilem fokusovaných primárních částic [26,102].

Mikroskopický režim MSI pracuje na principu současné ionizace všech molekul celého povrchu vzorku prostřednictvím nefokusovaného zdroje energie, přičemž dochází k zachování prostorové distribuce iontů v osách x a y . Z toho vyplývá, že mikroskopický režim je obecně ve srovnání se skenovacím módem technicky náročnější, a to konkrétně na iontovou optiku a detektor, který kromě hodnoty m/z musí zaznamenat také přesnou polohu dopadu iontu na detektor. Nespornou výhodou mikroskopického režimu MSI ve srovnání se skenovacím módem je vyšší prostorové rozlišení.

Jak vyplývá z výše napsaného, jedním z významných parametrů MSI experimentů je prostorové rozlišení. V případě skenovacího režimu prostorové rozlišení přímo závisí na typu použitého ionizačního zdroje. Rozdíly minimálních vzdáleností jednotlivých bodů rastru se tak mohou v souvislosti se zvolenou ionizační technikou pohybovat od desetin do stovek jednotek mikrometrů. Kromě prostorového rozlišení můžeme v případě MSI analýzy pracovat také s parametrem hloubkového rozlišení, které se vztahuje k ionizačním technikám pracujícím na principu postupné ablace vzorku a dále s hmotnostním rozlišením, které souvisí s typem hmotnostního analyzátoru MS [102,103,104,105].

3.3.2.1 Příprava vzorků pro MSI

Proces přípravy biologických vzorků pro MSI významně ovlivňuje výsledek analýzy, díky čemuž je nutné tomuto kroku věnovat zvýšenou pozornost. Samotný postup přípravy vzorků pro MSI se odvíjí především od charakteru vzorku, dále od vybrané desorpčně ionizační techniky a v neposlední řadě od analyzované skupiny látek a tím i celkového záměru experimentu.

3.3.2.2 Kryomikrotomické řezy biologických vzorků

Jedním z častých postupů úpravy biologických vzorků je jejich kryomikrotomické řezání. V případě MS/MSI analýzy biologických vzorků nepředchází samotnému krájení žádné histologické nebo jiné zpracování tkáně, ale naopak se doporučuje ponechat v tomto smyslu tkáňový vzorek intaktní. Díky tomu je tak jediným důležitým krokem přípravy vzorku pro kryomikrotomické řezání jeho včasné zamražení ideálně na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a to nejlépe ihned po vypreparování vzorku tkáně [99,106,107,108].

Krájení vzorků na plátky, jejichž tloušťka se pro většinu MS analýz pohybuje v rozmezí $10\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$, je z mnoha důvodů problematické. Náročnost zhotovení řezu se odvíjí od typu krájené tkáně (epitelová, pojivová, svalová tkáň nebo například intaktní hmyz atp.) a s tím souvisejícího charakteru tkáně (poměr množství vody a lipidů ve vzorku), na základě kterého volíme například vhodnou teplotu krájení, která se obecně nachází mezi $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. S rostoucím procentuálním zastoupením tukové složky ve vzorku volíme obecně vyšší teplotu krájení a naopak při vyšším obsahu vody ve vzorku je vhodné pracovat za nižších teplot. Čerstvé kryomikrotomické řezy tkání je nutné ihned přenést na vhodný podklad, kterým je nejčastěji podložní sklíčko, kovová destička popř. teflon a jiné polymery. Fixace řezu tkáně na podklad probíhá pomocí mírného zahřátí, a to většinou přiložením prstu operátora ze spodní strany podložního materiálu v oblasti, kde se nachází vzorek. Tento postup fixace řezu, který je většinou následně doplněn krokem sušení vzorku v exsikátoru za mírného vákua, vyžaduje určité zkušenosti, ale při správném provedení předchází poškození vzorku tím, že

nedochází k jeho praskání a ke změnám v prostorové distribuci molekul [99,106,107,108,109].

Ke zhotovování kryomikrotomických řezů problematicky zpracovatelných vzorků tkání lze využít některých fixačních médií. Mezi prvními v MSI používanými fixačními médii byla média původně využívaná v histologii. Ukázalo se však, že tato média nejsou pro MSI experimenty z důvodu přítomnosti polyethylenglykolů (PEG) a polyvinylalkoholů (PVA) příliš vhodná. Přítomnost těchto látek potlačovala ionizaci v oblasti vysokých hmotností a naopak v oblasti nízkých hmotností přítomnost iontových klastrů PEG a PVA komplikovala interpretaci naměřených MS spekter. Z toho důvodu se začalo využívat jiných typů fixačních médií například na bázi karboxymethylcelulosity nebo vodného roztoku želatiny [34,41].

V případě volby podložního sklíčka ve spojení s technikou MALDI se s výhodou využívá speciálního vodivého typu skla s napařenou vrstvou oxidu india a cínu (ITO – Indium-Tin Oxide) od společnosti Bruker Daltonics. Vodivý povrch mikroskopického sklíčka se vzorkem a rovný povrch vzorku jsou kritéria pro úspěšnou MALDI MS analýzu.

Pro některé typy MS/MSI analýz kryomikrotomických řezů tkání se doporučuje, před samotnou analýzu zařadit mezikrok spočívající v oplachu tkáně vzorku pomocí vhodného rozpouštědla. Volba rozpouštědla přímo souvisí s tím, jakou skupinu látek chceme analyzovat. Například při analýze proteinů zvyšujeme jejich výtěžnost tedy ionizaci proteinů/peptidů tím, že pomocí oplachů odstraníme ze vzorku nejprve soli (polární rozpouštědla) a následně lipidy (nepolární rozpouštědla) [106].

MSI kryomikrotomických řezů je možné využívat i k trojrozměrné vizualizaci sledovaných analytů [110].

3.3.2.3 Příprava trojrozměrných biologických vzorků

Příprava 3-D biologických vzorků pro MS analýzy je ve srovnání s postupem přípravy kryomikrotomických řezů v řadě ohledů náročnější.

Vzhledem k rozličným prostorovým dispozicím a obecně tkáňové různorodosti 3-D biologických vzorků se každý vzorek stává unikátním. V závislosti na tom, každý

takový vzorek vyžaduje specifické kroky přípravy, které jsou kromě jiného ovlivňovány i zvolenou desorpčně ionizační technikou.

Mezi parametry desorpčně ionizačních technik ovlivňující postup přípravy 3-D vzorků pro MSI analýzy jsou zejména podmínky desorpčně ionizačního procesu, které mohou probíhat buď za vakua, nebo v případě AIT za atmosférického tlaku, kdy je možné provádět i přímé analýzy nativních 3-D biologických objektů. V případě ionizačních technik pracujících za vakua je do postupu přípravy vzorku obecně nutné zařadit krok sušení. Během sušení ve většině případů dochází vlivem odpařování vody ke změnám objemu vzorku s přímým důsledkem projevujícím se v podobě jeho deformace. Změny tvaru vzorku přitom mohou velmi negativně ovlivnit výsledek analýzy, a to nejen díky změnám v prostorové distribuci molekul. Rozsah deformací vznikajících při sušení vzorku je možné ovlivnit prostřednictvím vhodné fixace 3-D vzorku na vzorkovací destičce.

V případě 3-D vzorků s méně výrazným profilem, mezi které můžeme řadit například vzorky listů, okvětní lístky nebo vzorky hmyzích křídel popř. krovek a dalších rostlinných [37,41] či živočišných tkání [111,112], lze pro fixaci na podložní materiál s úspěchem použít běžnou oboustrannou lepicí pásku. Na druhou stranu v případě 3-D vzorků nevykazujících planární charakter je již nutné využívat pro daný experiment resp. vzorek speciálně navržené vzorkovací destičky s profilovanými jamkami, které jsou přizpůsobené rozměrům daného 3-D vzorku.

V rámci přípravy 3-D biologických vzorků je v kontextu s výše uvedeným nutné dbát zvýšené opatrnosti při veškeré manipulaci se vzorky z důvodu možnosti jejich snadného poškození. Dalším nebezpečím při práci s 3-D biologickými vzorky je kromě jejich poškození i možnost kontaminace vzorku, ke které dochází, nejčastěji při manipulaci s pracovními nástroji, k nechtěnému přenosu sloučenin specificky lokalizovaných v jedné oblasti vzorku na oblast jinou. V neposlední řadě je možné při manipulaci se vzorkem vzorek kontaminovat lepidlem nebo jiným médiem určeným pro jeho fixaci na podložní destičku.

V obecné rovině je samotná fixace vzorku směřována, kromě předcházení deformacím, k dosažení co možná nejvíce planárního profilu 3-D vzorku, což samo o sobě usnadňuje jeho analýzu. Konzistentní profil vzorku je striktně vyžadován v případě MS/MSI analýzy 3-D biologického objektu prostřednictvím ionizační

techniky MALDI nebo jiných ionizačních technik pracujících s fokusovaným paprskem laseru nebo přístrojů vybavených TOF analyzátozem [102].

Je nutné zdůraznit, že v případě desorpčně ionizačních technik pracujících za vákua (MALDI) dochází ke ztrátám těkavých látek vyskytujících se na povrchu vzorku. Do určité míry lze těkavější sloučeniny na povrchu fixovat krokem aplikace resp. nanášením matrice na vzorek, při kterém dochází ke kokrystalizaci matrice právě s na povrchu přítomnými látkami. Ovšem na druhou stranu aplikace matrice na vzorek může negativně ovlivňovat a měnit prostorovou distribuci sloučenin na povrchu vzorku a proto, pokud je to z hlediska ionizovatelnosti analytů možné, je výhodnější pracovat v režimu bez matrice tj. v režimu LDI.

3.3.3 Volba MALDI matrice a její nanášení na vzorky

Zcela zásadním krokem přípravy biologického vzorku pro MALDI-MS analýzu je volba a nanášení matrice na vzorek. Výběr matrice úzce souvisí se zamýšleným experimentem potažmo s vlastnostmi analyzované skupiny látek [94]. Mezi nejvíce rozšířené MALDI matrice patří organické kyseliny, jako jsou DHB, CHCA nebo SA. Specifické vlastnosti každé z těchto matic určují její aplikační potenciál. Například matrice DHB umožňuje analyzovat cukry, glykopeptidy, glykoproteiny nebo lipidy [37]. CHCA je využívána pro analýzu peptidů a malých proteinů [23,113] a SA je zase možné použít při experimentech zaměřených na studium velkých proteinů [114].

V současné době probíhá intenzivní vývoj nových univerzálnějších nebo naopak specifitějších matic ionizujících pouze úzkou skupinu analytů.

Obečnou vlastností matrice při jejím nanášení na vzorek by měla být schopnost extrahovat molekuly analytu od povrchu vzorku a zároveň s daným analytem kokrystalizovat. Dalším důležitým parametrem je velikost krystalů matrice, která ovlivňuje prostorové uspořádání molekul analytu, což je významné v případě MSI experimentů. Ideální matrice by dále měla mít nízkou tenzi par ve vákuu a nijak by neměla reagovat s analyty.

Hlavním kritériem aplikace matrice na vzorek je získání homogenní vrstvy matrice a dostatečná reprodukovatelnost procesu jejího nanášení. S homogenitou vrstvy matrice úzce souvisí kvalita naměřených MS dat, a to potom zejména MSI dat.

Způsobů nanášení matrice na vzorek je celá řada. Tím nejjednodušším a zároveň nejméně kvalitním a reprodukovatelným je nanesení kapky roztoku matrice na povrch vzorku tj. tzv. metoda sušené kapky [95,96]. Další možnost nanášení matrice na vzorek spočívá ve schopnosti matrice sublimovat. Touto cestou lze získat dostatečně homogenní vrstvu například DHB matrice [31]. Sublimace probíhá za nízkého tlaku a relativně vysoké teploty. Ovšem skutečnost sublimující matrice neumožňuje provádět, vzhledem ke ztrátám matrice ve vysokém vákuu, časově náročnější MALDI MSI experimenty. Dalším způsobem je nanášení mikrokystalické formy matrice na vzorek v pevném stavu pomocí sítka s definovaným průměrem pórů.

Sofistikovanější postupy zahrnují například pneumatické zmlžování roztoku matrice za vzniku kapiček aerosolu, které dopadají na vzorek a tvoří, po optimalizaci spreje, více méně homogenní vrstvu matrice. Matrice je z tohoto pohledu nanášena v určitém počtu cyklů zahrnujících kroky zvlhčování vzorku rozpouštědlem a následné sušení vzorku. Z tohoto hlediska je důležité, aby tyto kroky byly v rovnováze a nedocházelo tak k přílišnému zvlhčování povrchu vzorku, které by vedlo ke změnám prostorové distribuce molekul obsažených na povrchu a ke změnám vlastností a především homogenity vrstvy matrice [37]. V důsledku toho by tak byla snížena kvalita a reprezentativnost naměřených dat.

Další možností je nanášení matrice tzv. chemickým tiskem, kdy jsou kapičky roztoku matrice nanášeny na povrch vzorku pomocí soustavy trysek obdobným těm, které se používají v inkoustových tiskárnách. Výhodou tohoto přístupu je jeho vysoká reprodukovatelnost vzhledem k tomu, že jsou vznikající kapičky identické resp. stejného objemu. Komerčně jsou tato zařízení vyráběna společnostmi Shimadzu nebo Labcyte.

Posledním z komerčně dostupných zařízení na nanášení reprodukovatelné vrstvy matrice je přístroj využívající jemného spreje vznikajícího z automatizovaného vibračního sprejového nanášeče. Přístroj komerčně známý pod názvem ImagePrep pracuje v uzavřeném systému s možností nastavení řady parametrů díky elektronicky kontrolovanému procesu nanášení matrice.

3.4 Metody využívané ke stanovení melaminu v mléčných produktech

Melamin neboli 2,4,6-triamino-1,3,5-triazin [115] je v průmyslu běžně používanou chemikálií k výrobě umělých hmot. Díky svojí relativně nízké toxicitě byl melamin po dlouho dobu (až do roku 1978) využíván také jako aditivum pro zvýšení obsahu dusíku v krmných směsích pro dobytek [116] a domestikovaná zvířata [117]. V roce 2008 bylo v Číně na základě mléka kontaminovaného vysokým množstvím melaminu (z důvodu umělého navýšení nutričních hodnot) otráveno a hospitalizováno kvůli akutnímu selhání ledvin [118] více jak 50 tisíc kojenců [119]. Na základě těchto skutečností bylo v rámci USA, EU a Číny zavedeno testování [120] mléčných výrobků na přítomnost melaminu. Tato událost tak dala podnět k rozvoji různorodých technik za účelem získání rychlé a spolehlivé analýzy melaminu v mléčných produktech.

Přístupy využívané ke stanovení melaminu v mléčných výrobcích můžeme rozdělovat do dvou základních skupin. První skupina zahrnuje techniky analytické chemie využívající konvenční přístrojové vybavení [121,122,123], zatímco druhá skupina představuje metody poskytující, v porovnání s první skupinou, rychlejší analýzu, ovšem méně přesnou. Využívá se tak například imunoanalytických metod [124], tištěných polymerních senzorů [125] nebo senzorů založených na nanočásticích [126]. Nevýhodou první uvedené skupiny analytických technik je nutnost přípravy vzorků, která většinou zahrnuje časově náročný krok chromatografické separace předcházející vlastní MS detekci.

V rámci analýzy melaminu tak na základě uvedených skutečností představují ve spojení s MS detekcí určitý kompromis ambientní ionizační techniky, které nevyžadují krok chromatografické separace a u kterých tak lze přípravu vzorku minimalizovat popř. ji i zcela vynechat [127]. Za účelem analýzy melaminu v mléce bylo během posledních let využito několik ambientních technik jako je DART [128], DAPCI [129], nebo ultrazvukem asistovaná extrakční elektrosprejová ionizace (EESI) [130].

Aplikace AIT pro analýzu melaminu v mléčných produktech je obecně cílena na vypracování rychlé, dostatečně citlivé a finančně nenáročné metody pro rutinní testování vzorků na hmotnostních spektrometrech s vysokým rozlišením.

3.5 Lipidomický profil novorozeneckého mázku

Novorozenecký mázek (vernix caseosa) je v surovém stavu bílá až lehce nažloutlá krémovitá hmota, která se tvoří během třetího trimestru těhotenství, a která plní celou řadu funkcí, a to jak uvnitř dělohy, kde například chrání plod před macerací, tak při porodu, kde slouží jako lubrikant. V neposlední řadě novorozenecký mázek poskytuje ochranu novorozenci v podobě snížení jeho tepelných ztrát a bariéry proti infekcím [131,132].

Vernix tvoří komplexní směs až s 80 % zastoupením vody, která je absorbovaná v přítomných buňkách, dále obsahuje kolem 10 % proteinů a přibližně stejný podíl lipidů. I přes vysoký obsah vody je vernix svojí povahou hydrofobní. Základní lipidomický profil vernixu odpovídá 25 % podílu triacylglycerolů (TGs), přibližně shodnému podílu sterolesterů (SE), dále 10 % podílu voskových esterů (WE) a shodnému 10 % podílu cholesterolu (CHOL). V menší míře (kolem 5 %) jsou potom zastoupeny volné mastné kyseliny (FFA), skvalen (SQ), diestery diolů (DD), ceramidy (CER) a fosfolipidy (PL) [133,134].

3.6 Alkaloidy rostliny oměj šalamounek

Alkaloidy jsou v obecné rovině dusíkaté, bazické a lipofilní sloučeniny, které se v rostlinách vyskytují ve formě solí, a to nejčastěji s organickými kyselinami. Alkaloidy jsou pro člověka, až na několik málo výjimek, prudké jedy. Složení alkaloidů i jejich obsah v různých částech rostliny je relativně proměnlivý a závislý na podmínkách okolního prostředí a na sezonně podmíněné vegetační fázi, v které se rostlina nachází. Rostlina zpravidla obsahuje jeden hlavní alkaloid a několik dalších strukturně podobných alkaloidů [135].

Alkaloidy vyskytující se v rostlinách rodu *Aconitum*, konkrétně v oměji šalamounek (Reichenbach, *Ranunculales*, *Ranunculaceae*) řadíme do podskupiny diterpenických alkaloidů. Alkaloidy jsou u oměje šalamounek (*Aconitum plicatum*) přítomny v celé rostlině, ovšem jejich obsah je nejvyšší v podzemní části rostliny tj. v kořenech a hlíze, které obsahují 0,3-3 % akonitinu a od něj odvozených alkaloidů jako jsou akonin, mesakonitin nebo hypakonitin. Akonitin (MH: 645,74 g/mol;

C₃₄H₄₇NO₁₁) neboli (1 α ,3 α ,6 α ,14 α ,16 β)-8-(acetyloxy)-20-ethyl-3,13,15-trihydroxy-1,6,16-trimethoxy-4-(methoxymethyl)akonitan-14-ylbenzoát je neurotoxický a kardiotoxický působící alkaloid a jeden z nejsilnějších rostlinných jedů vůbec, jehož smrtná dávka se pro člověka pohybuje v rozmezí 1-5 mg [136].

Akonitin se v současné době stále používá v tradičním čínském lékařství, a to v podobě sušeného kořene nebo tinktury [137,138]. Užívání drogy je vzhledem k toxicitě akonitinu a problematickému dávkování rizikové a často vede k otravám i k smrti uživatele [137,138,139,140].

Za účelem kontroly kvality komerčně dostupných drog s obsahem diterpenických alkaloidů a stejně tak pro analýzy vzorků v klinických laboratořích a laboratořích forenzního lékařství bylo vypracováno několik metod analýzy akonitinu a jemu příbuzných alkaloidů. Metody využívají například kapalinové chromatografie v kombinaci s ESI-MS detekcí [141,142], plynové chromatografie s hmotnostní detekcí [143] nebo kapilární zónové elektroforézy [144].

3.7 Kutikulární lipidy a chemická komunikace much octomilek obecných

Kutikula u hmyzu plní celou řadu funkcí, které jsou do určité míry podmíněné několika mikrometrů tenkou vrstvou lipidů na jejím povrchu. Kutikula poskytuje ochranu hmyzu před vnějším prostředím, a to jak na úrovni mechanické, tak i fyzikální, kdy organismus chrání před UV zářením nebo vodou. Kutikulární lipidy jsou tvořené především WE, uhlovodíky, ale i TGs, aldehydy, ketony, alkoholy, estery nebo i kyselinami. Složení a zastoupení jednotlivých lipidů je druhově podmíněné, přičemž některé z kutikulárních lipidů vykazují biologickou aktivitu [145,146,147].

Stejně jako u mnoha jiného hmyzu tak i u octomilek obecných je chemická komunikace zprostředkována zejména pomocí uhlovodíků přítomných na povrchu kutikuly [145]. V případě much octomilek obecných bylo pozorováno, že proces namlouvání, který předchází vlastní kopulaci, je významně ovlivňován specifickými kutikulárními lipidy [148,149,150]. V rámci těchto lipidů můžeme hovořit o ryze samičích a samčích biologicky aktivních látkách. U samic octomilek obecných se tak jedná například o sexuální feromony (Z,Z)-7,11-heptakosadien (7,11-HD) a (Z,Z)-7,11-nonakosadien (7,11-ND), jejichž primární funkce spočívá v atraktivování samců [151].

Výhradně samci je potom biosyntetizována látka *cis*-vakcenylyl acetát (cVA) neboli (Z)-oktadec-11-enyl acetát [152], který má hned dvě biologické funkce. cVA působí jako agregační faktor [153] pro samice a samce, a stejně tak plní roli inhibitoru samčího namlouvání [154]. cVA může plnit funkci inhibitoru samčího namlouvání z toho důvodu, že jej ve směsi s dalšími látkami v průběhu kopulace samec nanáší na tělo samice. cVA na povrchu samice působí jako anti-atraktant pro ostatní samce a je tak určitým indikátorem, že byla samice spářena [148]. Na úrovni inhibitoru samčího namlouvání funguje i další biologicky aktivní látka 3-*O*-acetyl-1,3-dihydroxy-oktakosa-11,19-dien (CH503) [11], která je spolu s cVA během kopulace nanášena na samici. V případě CH503 se však jedná o dlouhodobě působící inhibitor, který na povrchu samice zůstává až po dobu 10 dní, na rozdíl od cVA jehož působení je v průměru pouze 24 hodin [155].

4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

- Konstrukce univerzální platformy pro ambientní ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii uzpůsobené pro hmotnostní spektrometry Thermo Fischer Scientific.
- Testování univerzální platformy pro AIT v MS prostřednictvím modelového analytu rhodaminu B a reálných biologických vzorků v podobě vzorků rostliny oměj šalamounek a vzorků novorozeneckého mázku.
- Studium fundamentálních desorpčně ionizačních procesů uplatňujících se v DESI-MS.
- Analýza melaminu ve vzorcích mlék a smetany prostřednictvím techniky DAPPI-MS.
- Využití techniky MALDI-MSI pro analýzu biologických vzorků hmyzu: MALDI-MSI kutikulárních lipidů much octomilek obecných. MALDI-MSI kryomikrotomických řezů čmeláka zemního jako modelového organismu pro testování nového fixačního média na bázi PHPMA pro MALDI-MSI.
- GC/MS analýza hexanových extraktů much octomilek obecných.

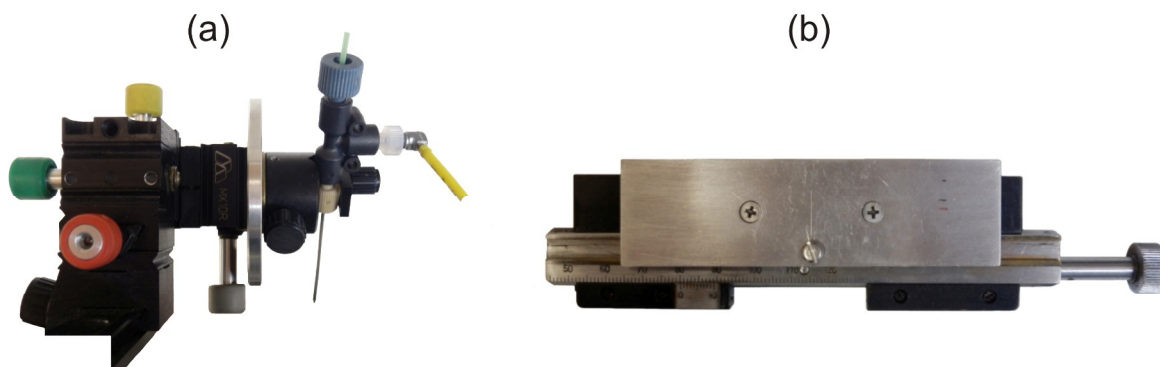
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Konstrukce univerzální platformy pro AIT typu DESI-MS a DAPPI-MS

Konstrukce platformy vycházela z designu a technického uspořádání kolem vstupní kapiláry hmotnostního spektrometru typu LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, USA). Vlastní platforma byla zkonstruována s ohledem na komponentu monobloku (dar od Dr. Michaela Volného) z tvrzeného eloxovaného hliníku vybaveného dvojicí na něj kolmých ocelových vodících tyčí (Obr. 5.1). Na základě parametrů a dispozice vodících tyčí, které byly spolu s hliníkovým monoblokem na zakázku vyrobeny v USA, byly ve spolupráci s Vývojovými dílnami UOCHB AV ČR, v.v.i. navrženy dvě základní nosné komponenty z tvrzeného plastu (polyoxymethylen (POM), Hostaform®). Každá z komponent byla projektována s vysokou variabilitou konstrukce s ohledem pro případné budoucí změny dispozic. Kromě toho bylo možné každou komponentu výškově nastavovat pomocí mikrometrického šroubu umístěného v její spodní části a dle potřeby na tyčích posouvat a aretovat ve vybrané pozici. Komponenta blíže k inletu MS (Obr. 5.2a) byla uzpůsobena jako vzorkovací stolek a druhá z komponent jako adaptér pro 3-D mikromanipulátor sprejeru s označením MX10R (Siskiyou corporation, USA), který umožňoval 3-D jemné nastavení geometrie (Obr. 5.2b).

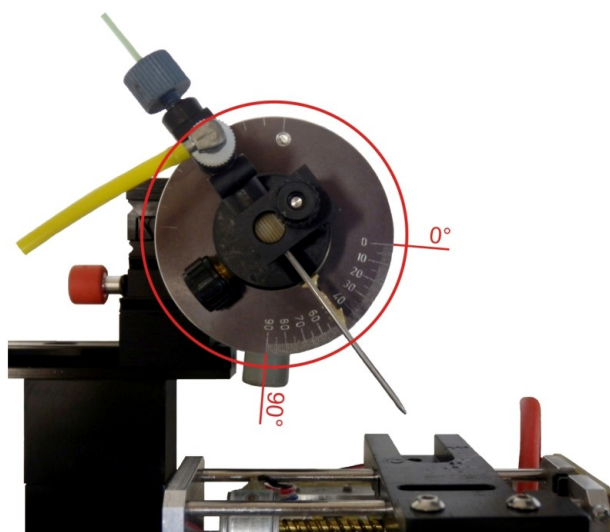


Obr. 5.1 Základní konstrukční komponenta univerzální platformy pro AIT. (a) Pohled shora na dvojici ocelových lyžin a profilovaný hliníkový monoblok. (b) Pohled z boku na dvojici ocelových lyžin a profil hliníkového monobloku.



Obr. 5.2 Nástavba základní dvojice funkčních komponent univerzální platformy pro AIT. (a) Boční profil 3-D mikromanipulátoru MX10R s upnutým DESI sprejerem. (b) Pohled shora na manuální komponentu vzorkovacího stolku.

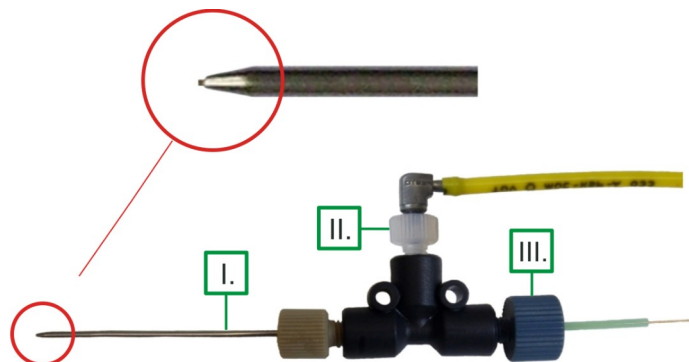
K výše popsanému konstrukčnímu řešení DESI zdroje, konkrétně ke komponentě 3-D mikromanipulátoru, byl později připojen na zakázku vyrobený prvek sloužící k přesnému odečtu úhlu, pod kterým byl DESI sprejer nastavený (Obr. 5.3).



Obr. 5.3 Detail konstrukčního prvku připojeného na 3-D mikromanipulátor MX10R sloužící pro přesný odečet úhlu nastavení DESI sprejeru nebo DAPPI skleněného čipu.

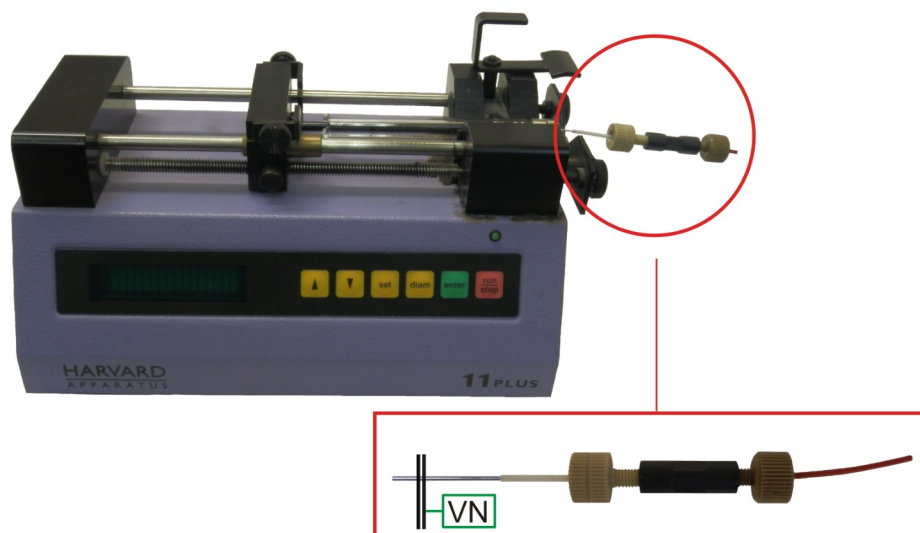
Samotný DESI sprejer byl vyrobený z HPLC spojky T-tvaru (Upchurch Scientific, USA) a z koaxiálně vedené vnější ocelové a vnitřní křemenné kapiláry. Na základě řady měření byly vybrány vhodné rozměry jednotlivých kapilár a tím i

zoptimalizovány parametry sprejeru. Ocelová kapilára o celkové délce 57 mm měla vnitřní průměr 0,5 mm a vnější průměr 1,6 mm. Konec ocelové kapiláry orientovaný vně těla sprejeru byl za účelem zvýšení kvality a stability spreje vybroušen do kónického tvaru (Obr. 5.4).



Obr. 5.4 Laboratorně sestavený DESI sprejer s tělem z T-spojky. (I) Ocelová kapilára s vnitřně koaxiálně vedenou křemennou kapilárou sloužící k přívodu sprejovací kapaliny do sprejeru. V detailu kónicky vybroušené ocelové kapiláry je vidět záměrně nastavený přesah křemenné kapiláry. (II) Vstup T-spojky využitý pro přívod nebulizačního plynu dusíku do mezikruží ocelové a křemenné kapiláry. (III) Pomocí šroubení fixovaná křemenná kapilára přivádějící sprejovací kapalinu, na kterou bylo vkládáno vysoké napětí (cca 5 kV).

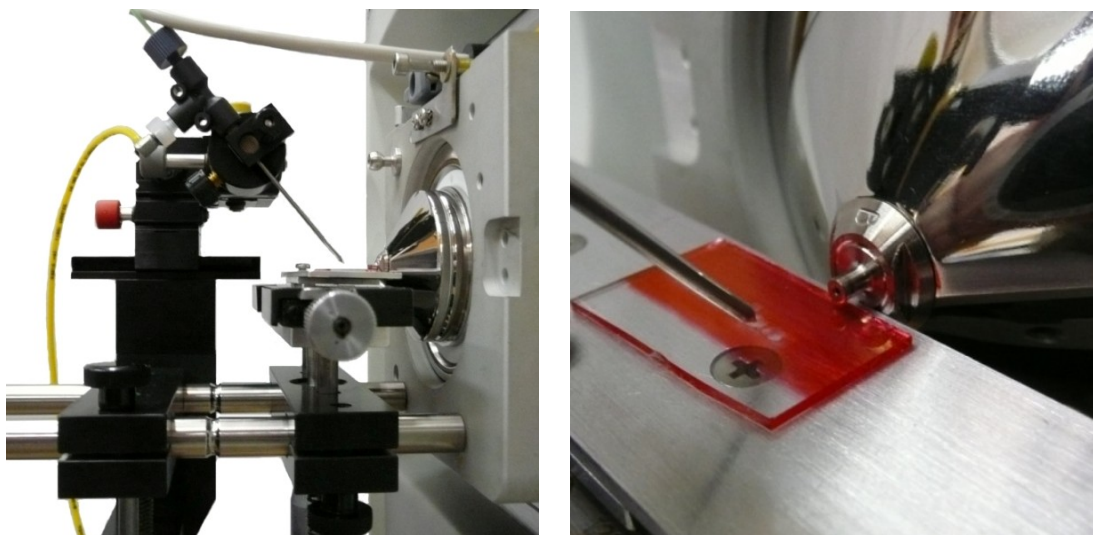
Jak již bylo zmíněno, ocelovou kapilárou i samotným tělem sprejeru z T-spojky byla koaxiálně vedena křemenná kapilára přivádějící sprejovací kapalinu. Křemenná kapilára potažená vrstvou polyimidu měla vnější průměr 400 μm a vnitřní 100 μm . Pomocí šroubení byla do T-spojky z jedné strany upevněna ocelová kapilára, kterou vnitřně procházela kapilára křemenná. Poslední volný vstup T-spojky byl využitý pro přívod nebulizačního plynu, kterým byl dusík. Vysoké napětí (VN) ovládané, stejně jako průtok dusíku, uživatelským rozhraním MS resp. softwarem Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fischer Scientific) bylo na sprejer vkládáno přes sprejovací kapalinu, jejíž průtok byl regulován pomocí externí stříkačkové pumpy (Harvard 11 Plus, Harvard Apparatus, USA) viz Obr. 5.5. Konkrétně byl vysokonapěťový kabel z MS pomocí krokosvorky připojen na ocelovou jehlu stříkačky (Hamilton®). Za účelem eliminace nabíjení jednotlivých komponent zdroje a zároveň k zajištění bezpečnosti obsluhy byl celý DESI ionizační zdroj uzemněn na kostru MS.



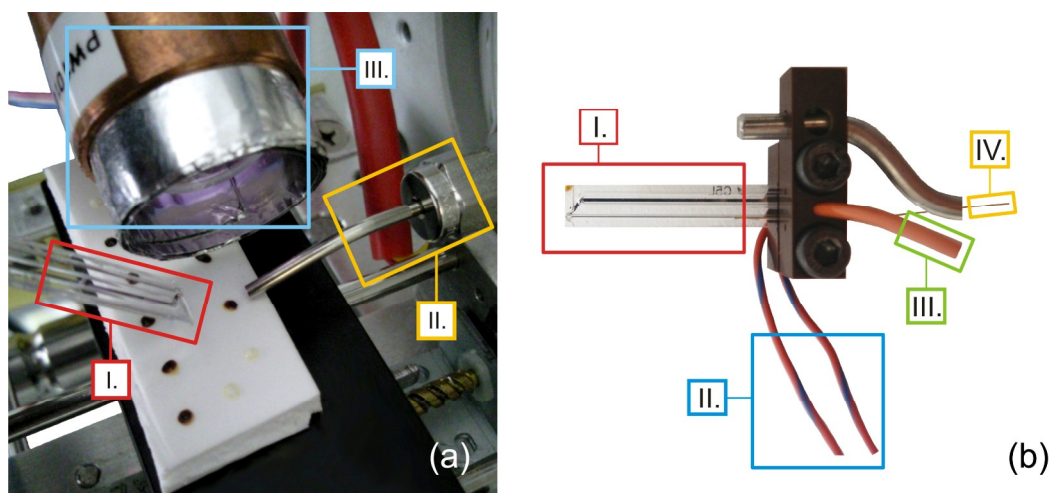
Obr. 5.5 Externí stříkačková pumpa pro přívod MF do DESI resp. DAPPI sprejeru s detailem šoubení a spojky zajišťující spojení ocelové jehly stříkačky (pomocí krokosvorky vloženo VN) a PEEK kapiláry připojené k vlastnímu sprejeru.

Konstrukční řešení a design celé univerzální platformy (demonstračně sestavené jako DESI-MS), která byla pomocí nosné konstrukce připojena k hmotnostnímu spektrometru LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, USA) je vyobrazena spolu s detailem atmosférického vstupu MS na Obr. 5.6.

V případě využití univerzální AIT platformy pro DAPPI experimenty byl do komponenty obsahující 3-D mikromanipulátor upnut namísto DESI sprejeru DAPPI skleněný mikročip viz Obr. 5.7. Vyhřívání tohoto mikročipu a nastavování teploty za účelem zplyňování sprejovací kapaliny bylo zprostředkováno pomocí externího zdroje IPS-603 (ISO-TECH, UK). Samotný průtok sprejovací kapaliny byl potom ovládaný pomocí externí stříkačkové pumpy Harvard 11 Plus (Harvard Apparatus, USA). Průtok nebulizačního plynu dusíku mikročipem byl řízený prostřednictvím uživatelského rozhraní MS, a to konkrétně softwarem Xcalibur 2.0.7. Jako konstrukční prvek DAPPI zdroje zajišťující fotoionizaci byla použita UV lampa pro atmosférický fotoionizační zdroj (APPI) od výrobce Heraeus Noblelight (USA), která byla připojena na zdroj napětí s označením ALU 210 (ZPA KOŠÍŘE - Závody Děčín, Česká republika).



Obr. 5.6 Univerzální platforma pro AIT v uspořádání DESI-MS. (a) DESI sestava univerzální platformy v podobě nosné konstrukce a komponent držáku 3-D mikromanipulátoru MX10R s DESI sprejerem a manuálního vzorkovacího stolku. (b) Detail komponenty vzorkovacího stolku se vzorkem podložního skla s naneseným Rhodaminem B, ocelovou kapilárou DESI sprejeru a standardní vstupní kapilárou MS.



Obr. 5.7 Detailní zobrazení DAPPI ionizačního zdroje a DAPPI sprejeru. (a) Geometrie uspořádání DAPPI ionizačního zdroje vzhledem ke vzorkům naneseným na PTFE povrchu (a-I.) Skleněný DAPPI sprejer. (a-II.) Prodloužená kapilára atmosférického vstupu MS. (a-III.) Ústí UV lampy. (b) Detailní zobrazení DAPPI čipu. (b-I.) Skleněná část DAPPI čipu s nataveným odporovým drátkem pro jeho vyhřívání a s vnitřní kapilárou přinášející SK. (b-II.) Elektrické vodiče odporového drátku. (b-III.) PEEK kapilára přivádějící nebulizační plyn. (b-IV.) Křemenná kapilára potažená polyimidem přivádějící SK do těla sprejeru.

Bez ohledu na Obr. 5.6, kde byla použita klasická rovná, neprodloužená ocelová kapilára atmosférického vstupu MS, byly všechny experimenty s DESI/DAPPI ionizačním zdrojem provedeny s využitím prodloužené kapiláry (Obr. 5.8) atmosférického vstupu hmotnostního spektrometru, jejíž, ohnuté ústí pod úhlem cca 25°, bylo fixováno do těsné blízkosti vzorku. Díky tomu byl záchyt vznikajících iontů a jejich směřování do MS daleko efektivnější, než jak by tomu bylo v případě totožných experimentů s klasickou rovnou kapilárou.



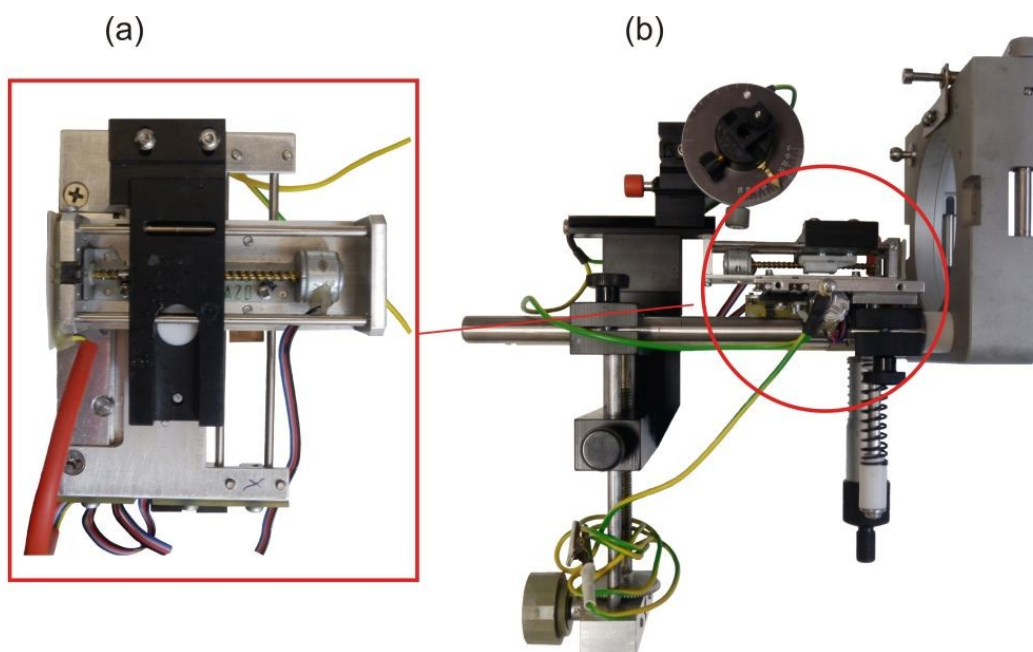
Obr. 5.8 Prodloužená kapilára (Prosolia, USA) atmosférického vstupu hmotnostního spektrometru.

5.1.1 Přestavba manuální platformy pro AIT na motorizovanou

Záměr přestavby manuální platformy pro AIT na motorizovanou souvisel s obecně vysokým aplikačním potenciálem ambientních ionizačních technik pracujících v režimu MSI, a to především v případech jejich využití při povrchových analýzách různých typů intaktních biologických vzorků. Jak již bylo v textu výše napsáno, hlavní výhoda motorizované platformy tj. platformy pracující v režimu 2-D zobrazování spočívá v získání komplexní informace o distribuci sledovaných analytů napříč celým analyzovaným povrchem vzorku s možností volby rastru a dalších parametrů měření. Je nutné zmínit, že obecně lze v případě motorizovaného zdroje kromě 2-D režimu analýzy pracovat také v režimu 1-D, který představuje analýzu napříč daným vzorkem v rámci jedné linky, jejíž počáteční a konečný bod je nastaven pomocí softwaru.

Samotná přestavba byla projektována s ohledem na co nejvyšší univerzálnost platformy. Motorizace probíhala na úrovni komponenty nesoucí vzorkovací stůlek. Původní stůlek z hliníkového profilu s manuálním pravo-levým posunem zprostředkovaným mikrometrickým šroubem, byl nahrazen složeným stolcem z tvrzeného plastu (polyoxymethylen (POM), Hostaform®) se dvěma páry kovových vodičích tyčí umožňující posun v osách X a Y, mezi kterými byly umístěny krokové elektromotorky s trapézovými šrouby (Obr. 5.7). Použité elektromotorky, které byly

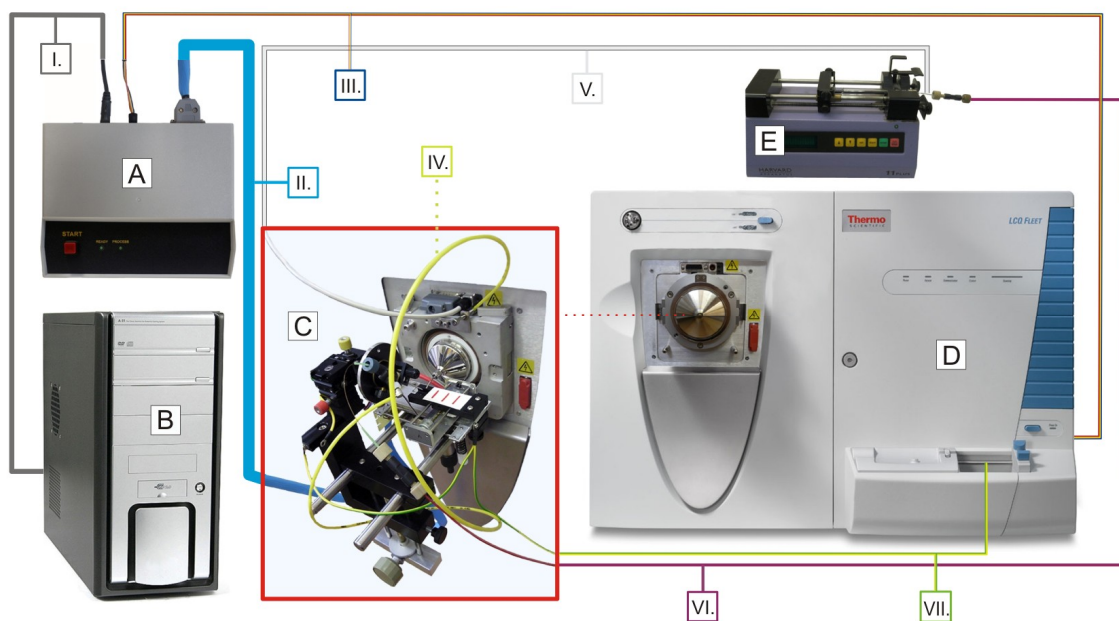
původně součástí posuvu CD mechanik, zajišťovaly definovaný posuv o velikosti mikrokroku s hodnotou 0,057 mm. Rozsah posunu stolku v ose X byl vyprojektovaný na 0 – 25 mm a v ose Y 0 – 48 mm. V souvislosti s tím byl pojezd v ose Y nastavený jako jednochodý a v ose X naopak jako dvouchodý se spodní limitní rychlostí 0,1 mm za vteřinu. Krokování motorku bylo řízeno elektronickým komutátorem, který na každý vstupní puls z řídicího systému posunul se vzorkovacím stolem, resp. pootočil motorkem o 1 mikrokrok ve směru daném volbou příslušného vstupního signálu. Motorky pracovaly v tzv. otevřené smyčce tedy bez další zpětné vazby. Nastavení potřebné polohy tak probíhalo pouze vysláním příslušného počtu pulsů včetně signálu o směru otáčení. Jedinou zpětnou vazbou tak byla detekce tzv. „nulové“ polohy, která byla v obou osách realizována optickou závorou.



Obr. 5.7 Motorizovaná univerzální platforma AIT. (a) Detailní pohled shora na motorizovaný vzorkovací stolek. (b) Boční pohled na celou platformu s vyznačenou lokací komponenty motorizovaného vzorkovacího stolku.

Jako řídicí jednotka byl použit mikropočítač ARDUINO Mega (Smart Projects Co., Čína), jehož výstupními signály byly kromě pulsů definujících rozsah a směr posuvu, také synchronizační signály s hmotnostním spektrometrem. Naopak vstupními

signály byly pouze stavové signály z již zmíněných optických závor. Řídící jednotka byla dále přes USB kabel propojena s nadřazeným PC, pomocí kterého bylo přes uživatelské rozhraní na заказku napsaného softwaru možné zadávat pokyny řídící jednotce stolku a zároveň realizovat sběr naměřených dat resp. hmotnostních spekter viz schéma Obr. 5.8.



Obr. 5.8 Schéma zapojení motorizovaného DESI zdroje připojeného k hmotnostnímu spektrometru LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, USA). (A) Řídící elektronika DESI zdroje. (B) PC. (C) DESI ionizační zdroj. (D) Hmotnostní spektrometr. (E) Externí stříkačková pumpa. (I) USB kabel spojující řídící elektroniku DESI zdroje s PC. (II) Komunikační kabel spojující řídící elektroniku a motorizovaný DESI vzorkovací stolek. (III) Komunikační kabel propojující řídící elektroniku DESI zdroje s MS. (IV) PVC kapilára přivádějící nebulizační plyn z MS do DESI sprejeru. (V) Vysokonapěťový kabel přivádějící napětí z MS na ocelovou jehlu Hamilton stříkačky se SK upnutou v externí pumpě. (VI) PEEK kapilára přivádějící SK s vloženým vysokým napětím z externí stříkačkové pumpy do DESI sprejeru. (VII) Zemní kabel vedoucí od DESI zdroje na kostru MS.

Software resp. firmware s označením Xcalibur Scanner ver.1.0.1. pro řídící jednotku ovládající motorizovaný vzorkovací stolek byl napsán v jazyce C++ pro překladač CodeVision V2.05.0 (HP InfoTech s.r.o). Stejně tak program pro PC byl napsán v jazyce C++ pro Microsoft Visual Studio 2008. Komunikace na úrovni

softwaru mezi PC a řídicí jednotkou tak na základě výše napsaného probíhala následujícím způsobem. Program řídicí jednotky obdržel data pro posuv vzorkovacího stolku z programu od nadřazeného PC a okamžitě po obdržení signálu pro spuštění sekvence aktivoval synchronizační signál pro sběr dat, čímž byla zahájena akvizice. Vzhledem k přesnému časování pohybu stolku bylo potom dosaženo synchronizace a tím jednoznačného přiřazení sbíraných dat s polohou stolku resp. s danou analyzovou oblastí vzorku.

Přestavba manuální platformy pro AIT na motorizovanou a stejně tak softwarové řešení ovládání posuvu vzorkovacího stolku bylo realizováno v rámci Vývojových dílen ÚOCHB AV ČR, v.v.i.

Experimenty prováděné s využitím výše popsaného motorizovaného vzorkovacího stolku bylo možné designovat jak pro 2-D zobrazování resp. povrchové analýzy, tak i pro experimenty v režimu 1-D. Přístupu 1-D bylo možné využívat například při rychlé povrchové analýze lokalizovaných skvrn nebo sledovaného analytu na vyvinuté TLC desce, která byla, upevněna na vzorkovacím stolku a skenována při nastavených parametrech měření v jedné definované lince napříč analyzovaným vzorkem TLC desky nebo jakéhokoliv jiného materiálu.

5.2 DAPPI-MS

Veškeré DAPPI-MS experimenty a jejich výstupy prezentované v této práci byly provedeny na přístroji LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA) s využitím univerzální AIT platformy adaptované pro DAPPI instrumentaci. Pro adjustaci UV lampy byl využit standardní laboratorní stojan vybavený křížovou svěrkou a klemou.

5.2.1 Úprava vzorků tkání pro DAPPI-MS analýzy

Potenciál AIT DAPPI-MS byl demonstrován v rámci dvou projektů. První z nich byl zaměřený na analýzu melaminu ve vzorcích mléka a druhý projekt se věnoval studiu lipidomického profilu novorozeneckého mázku.

5.2.1.1 Analýza melaminu v mléčných výrobcích

Vzorky pro analýzu melaminu v mléce byly připraveny z různých druhů komerčně dostupných mlék, která se vzájemně lišila množstvím obsaženého tuku. V rámci DAPPI-MS experimentů byla vybrána mléka s obsahem tuku 0,5 % (nízkotučné mléko), 1,5 % (polotučné mléko) a 3,5 % (plnotučné mléko) a dále smetany s obsahem tuku 8 % a 16 %. Samotná příprava vzorků spočívala v přidavku definovaného množství melaminu a interního standardu do připravených vzorků mlék. Přídavek melaminu, v podobě MilliQ roztoku, do vzorků mlék a smetan, představoval množství odpovídající výsledné koncentraci 0,1 mg/kg; 1,0 mg/kg a 2 mg/kg melaminu. Přídavek MilliQ roztoku interního standardu 2,3-diaminopyridinu (2,3-DAP) byl pro všechny vzorky shodný a odpovídal výsledné koncentraci 6 mg/kg.

Samotné volbě 2,3-DAP interního standardu předcházelo testování jeho vhodnosti v systému melamin/mléko na základě sestrojení kalibrační přímky a jejího vyhodnocení. Jako kalibrační body přímky byly zvoleny následující koncentrace melaminu v mléce: 0,5 mg/kg, 1 mg/kg; 2 mg/kg; 5 mg/kg a 10 mg/kg. Pro všechny kalibrační vzorky byl přídavek 2,3-DAP konstantní (6 mg/kg).

Finální krok přípravy vzorků mlék s melaminem, i kalibračních vzorků, pro DAPPI-MS spočíval v nanesení resp. pipetování mlék na vzorkovací povrch v podobě porézního PTFE 2 (Small Parts, USA). Každý spot vzorku odpovídal 1 µl mléka. Porézní PTFE byl předem nastříhán z velkoformátové desky na vhodnou velikost odpovídající cca 6 x 2,5 cm. Vzhledem k relativně dobré termostabilitě melaminu a zvoleného interního standardu 2,3-DAP bylo možné urychlit proces sušení nanesených vzorků pomocí jejich zahřátí (cca 50 °C) na vzorkovacím povrchu umístěném na elektrické plotně.

5.2.1.2 Analýza novorozeneckého mázku

Vzorky vernixu pro DAPPI-MS experimenty byly odebírány do skleněných vialek z tmavého skla přímo po porodu na Gynekologicko-porodnické klinice 1. LF UK a VFN. Ihned po odběru byly vzorky zamrazeny na -20 °C. Vzorky mázku chlapců a dívek byly smíchány v hmotnostním poměru 1:1 a zhomogenizovány. Využito bylo

dvou odlišných extrakčních metod [156,157]. Každá z nich pracovala s 200 mg surového vernixu, který byl suspendován v methanolu a střídavě promícháván na vortexu (Vortex Genie 1, Scientific Industries, USA). V případě metody extrakce lipidů dle Folche (označení FOLCH) byl k takto rozpuštěnému vzorku vernixu přidán chloroform a vzniklá suspenze byla následně při laboratorní teplotě míchána na vortexu po dobu 1 hodiny. Dalším krokem byl přidavek MilliQ vody a centrifugace (10 minut při 1000 g). Přítomná organická fáze byla odebrána a vzorek byl pomocí proudu dusíku odpařen do sucha. Zbylá vodná fáze byla výše popsaným postupem opětovně extrahována přidavkem rozpouštědla, které bylo následně opět odpařeno. Lipidy získané z první extrakce i z re-extrakce byly vždy smíchány dohromady. Postup extrakce v případě druhé extrakční metody s označením MTBE byl shodný s metodou FOLCH až na bod přidavku chloroformu, který byl nahrazený methyl-*terc*-butyl etherem (MTBE). V případě extrakce lipidů dle Folche byly jednotlivé přidavky rozpouštědel methanol:chloroform:voda (1,5 ml : 3 ml : 1,25 ml). Pro reextrakci vodné fáze byl potom extrakční poměr změněn na methanol:chloroform:voda (14 : 86 : 1). U extrakční metody MTBE byly jednotlivé přidavky rozpouštědel methanol:MTBE:voda (1,5 ml : 5 ml : 1,25 ml) a pro re-extrakci vodné fáze byl extrakční poměr změněn na methanol:MTBE:voda (6 : 20 : 5).

Takto získané extrahované lipidy vernixu ve formě jasně žlutého oleje připravené Mgr. Radkou Míkovou v laboratořích ÚOCHB AV ČR, v.v.i. byly v roztoku o koncentraci 100 µg/µl pipetovány na čistý PTFE povrch v objemu 5 µl/vzorek a podrobeny DAPPI-MS analýze.

5.2.2 Podmínky měření pro DAPPI-MS analýzy

V rámci všech DAPPI-MS experimentů byl nastaven výkon zdroje na 4,2 W, což přibližně odpovídalo teplotě skleněného DAPPI mikročipu na úrovni 320 °C [76]. Průtok nebulizačního plynu mikročipem byl optimalizovaný na hodnotu 6 arbitrárních jednotek (přibližně 0,2 l/min). Průtok SK přiváděné na DAPPI sprejer pomocí externí stříkačkové pumpy byl nastaven na hodnotu 10 µl/min. Napětí pro UV lampu zajištěné prostřednictvím externího zdroje odpovídalo 24 V.

Z důvodu maximalizace výtěžnosti ionizace molekul vzorku bylo před vlastní analýzou nejprve nutné optimalizovat vzdálenosti soustavy UV lampa, skleněný mikročip, vzorek. Ústí UV lampy, tvořené křemenným okem, bylo umístěno ve vzdálenosti méně než 1,5 cm od místa dopadajícího paprsku spreje tvořené SK na vzorek tak, aby byla účinnost atmosférické fotoionizace termálně desorbovaného analytu co nejvyšší [18]. Obdobně byla minimalizována i vzdálenost trysky mikročipu vzhledem ke vzorku nanesenému na vzorkovacím povrchu, a to konkrétně na hodnotu 6 mm. Zároveň s tím byl skleněný mikročip nastaven tak, aby svíral úhel 45° vzhledem k povrchu s naneseným vzorkem, díky čemuž byly vznikající ionty směřovány přímo do prodloužené kapiláry atmosférického inletu MS.

V rámci již zmíněných projektů analýzy melaminu v mléce a studia novorozeneckého mázku bylo v obou případech použito optimalizované DAPPI-MS instrumentace na základě výše popsaných parametrů. Významně odlišné však bylo složení použitých SK. V případě analýzy melaminu byl SK čistý toluen, zatímco u studia lipidomického profilu novorozeneckého mázku byla SK složená z acetonu s přídavkem 2 % 1 M vodného roztoku octanu amonného, který usnadňoval ionizaci sledovaných analytů.

Akvizice DAPPI-MS dat prostřednictvím softwaru Xcalibur 2.0.7 probíhala výhradně v režimu detekce pozitivních iontů, a to v hmotnostním rozsahu m/z 50–300 v případě analýzy vzorků melaminu v mléce a v případě analýzy vzorků novorozeneckého mázku v rozsahu m/z 150–1200.

5.3 DESI-MS

DESI-MS experimenty uvedené v této práci byly provedeny na přístroji LCQ Fleet (Thermo Fischer Scientific, USA) s využitím univerzální AIT platformy adaptované pro DESI instrumentaci.

V případě nano-DESI experimentů bylo využito přístroje Finnigan LCQ Classic (Thermo Fischer Scientific, USA) nastaveném v experimentálním uspořádání prezentovaném v publikacích Ranc *et al.* [158,159]. Nano-DESI experimenty byly provedeny týmem prof. Karla Lemra na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

5.3.1 Úprava vzorků pro DESI-MS analýzy

Vzhledem k povaze ambientní ionizační techniky DESI-MS bylo možné postup přípravy vzorků pro DESI-MS analýzy zcela minimalizovat, a omezit se pouze na kroky nanesení popř. fixace vzorku resp. analytu na vzorkovací destičku z vhodného materiálu.

5.3.1.1 Analýza modelového analytu rhodaminu B

V souvislosti s konstrukcí univerzální AIT platformy a jejím vývojem bylo nutné, v případě DESI-MS experimentů s laboratorně sestaveným DESI sprejerem, provést několik optimalizačních kroků. Optimalizace probíhala na úrovni vzdáleností a nastavení úhlů soustavy: ústí sprejeru - povrch s naneseným analytem - ústí atmosférického inletu MS a dále na úrovni průtoků SK, nebulizačního plynu a velikosti vkládaného napětí na sprejer. Jako vhodný analyt pro tyto experimenty se ukázal rhodamin B, který byl vybrán jednak pro svoji snadnou ionizovatelnost v režimu DESI-MS, ale zároveň i pro jednoduchost a reprodukovatelnost jeho nanášení na vybraný vzorkovací povrch.

V rámci experimentů s modelovým analytem rhodaminem B bylo využito několik typů vzorkovacích povrchů. V případě DESI-MS experimentů se skleněným povrchem bylo použito standardního mikroskopického podložního skla (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs, Německo). Dále byly používány dva typy porézního teflonu s pracovním označením PTFE 1 (Fluoro-Plastics, USA) a PTFE 2 (Small Parts, USA). Posledním testovaným povrchem byly komerční desky pro tenkovrstvou chromatografii (02599 Fluka - Sigma Aldrich, Česká republika).

Rhodamin B byl ve všech případech aplikován na zvolený povrch pomocí červeného permanentního fixu značky Sharpie (Sharpie, USA). Díky tomuto způsobu nanášení analytu, který byl poprvé publikován v práci Ifa *et al.* [160], bylo možné dosáhnout reprodukovatelné homogenní vrstvy analytu. Rhodamin B byl na povrch deponován v podobě třech linek od sebe vzdálených 1 cm, které byly postupně analyzovány napříč vzorkovací destičkou.

5.3.1.2 Studium procesů desorpce a ionizace při DESI-MS experimentech

Pro objasnění některých fundamentálních desorpčně ionizačních procesů, ke kterým dochází během DESI-MS experimentů bylo použito sprejovací kapaliny v podobě koloidního roztoku nanočástic o chemickém složení Fe_3O_4 .

Nanočástice s definovanou velikostí 35 ± 4 nm připravené mikroemulzní metodou byly získány z ústavu Anorganické chemie Akademie věd České republiky, v.v.i.

Příprava koloidního roztoku nanočástic Fe_3O_4 spočívala v přidání předem odváženého 1 mg suchých nanočástic do 2 ml methanolu. Výsledná suspenze byla sonikována po dobu 5 minut a během dalších 5 minut probíhala dekantace s následnou centrifugací (10000 rcf, 3 min.) za účelem odstranění vzniklých agregátů nanočástic. Takto získaný koloidní roztok byl okamžitě použitý jako SK pro DESI-MS analýzu, a to v kombinaci s několika typy vzorkovacích povrchů, na které byl nanesený modelový analyt rhodamin B v podobě malé tečky. Jako vzorkovací povrchy byly použity porézní teflony PTFE 1 a PTFE 2 a dále mikroskopické podložní sklo (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs, Německo).

Ke studiu povrchových formací vznikajících při desorpčně ionizačních procesech bylo kromě jiného využito také feromagnetických vlastností použitých Fe_3O_4 nanočástic, a to tím způsobem, že byl pod vzorkovací povrch v místě s naneseným rhodaminem B vložen slabý permanentní magnet.

5.3.1.3 Analýza biologických vzorků rostliny oměj šalamounek

Přístup DESI-MS byl kromě modelových analytů využit také pro analýzu reálných biologických vzorků, a to konkrétně vzorků rostlin oměje šalamounek.

Analýza vzorků oměje byla cílena na alkaloid akonitin. V rámci DESI-MS povrchové analýzy byl analyzován kořen a intaktní nadzemní část rostliny. Analýza probíhala bezprostředně po odstřížení příslušné části rostliny a prakticky bez jakékoliv přípravy vzorku. Jediným krokem přípravy bylo fixování vzorku na podložní mikroskopické sklo pomocí oboustranné lepicí pásky.

Z bezpečnostního hlediska bylo nutné vzhledem k vysoké toxicitě resp. neurotoxicitě analyzovaného akonitinu a dalších v rostlině přítomných alkaloidů důsledně používat standardní ochranné pomůcky (gumové rukavice, ochranné brýle, laboratorní plášť a základní typ filtrační polomasky). Zvýšené opatrnosti bylo nutné dbát zejména v případě možné kontaminace pracovního prostředí. Z toho důvodu byla v laboratoři vyčleněna pracovní plocha sloužící výhradně pro přípravu vzorků s obsahem akonitinu. Veškerý akonitinem kontaminovaný laboratorní materiál byl shromažďován a likvidován odděleně od ostatního laboratorního odpadu.

5.3.2 Podmínky měření pro DESI-MS analýzy

Optimalizace experimentálních podmínek DESI-MS a zároveň i laboratorně sestaveného DESI sprejeru byla provedena pomocí modelového analytu rhodaminu B v kombinaci s několika typy vzorkovacích povrchů. Stejného analytu a obdobného nastavení DESI-MS parametrů bylo dále využito ke studiu základních desorpčně ionizačních mechanismů uplatňujících se v DESI. Jako demonstrace aplikačního potenciálu DESI-MS byly provedeny experimenty s intaktními částmi rostliny oměj šalamounek.

5.3.2.1 Podmínky měření analýzy rhodaminu B

Experimentální podmínky DESI-MS analýzy modelového analytu rhodaminu B odpovídaly průtoku nebulizačního plynu dusíku na úrovni 60 arbitrárních jednotek (arb), tedy přibližně 2 l/min. Hodnota vkládaného vysokého napětí na sprejer byla 5,5 kV a průtok sprejovací kapaliny, kterou tvořil methanol, byl nastaven na 8 μ l/min.

Průtok dusíku a hodnota vysokého napětí byly nastaveny prostřednictvím uživatelského rozhraní hmotnostního spektrometru, zatímco průtok SK byl ovládán prostřednictvím externí stříkačkové pumpy (Harvard 11 Plus, Harvard Apparatus, USA). Pracovní teplota kapiláry atmosférického vstupu MS byla nastavena na 200 °C.

Úhel, pod kterým byla SK sprejována vůči vzorkovacímu povrchu resp. vzorku, byl optimalizovaný a odpovídal 50°, zatímco úhel pod kterým byly do atmosférického

inletu MS směřovány sekundární kapičky spreje, byl přibližně v rozmezí 10 – 15°. Tyto hodnoty se ukázaly jako univerzální v kontextu s použitou konstrukcí AIT platformy, DESI sprejerem a výše uvedenými parametry, díky čemuž bylo možné toto nastavení používat i v rámci ostatních DESI-MS projektů popsaných níže.

Analýza rhodaminu B aplikovaného na příslušném vzorkovacím povrchu probíhala s definovanou rychlostí posunu vůči statickému sprejeru, a to s hodnotou 0,1 mm/s. K analýze bylo použito motorizované DESI instrumentace pracující v režimu 1-D a ovládané softwarem Xcalibur Scanner ver.1.0.1. Měření probíhala v režimu detekce pozitivních iontů v hmotnostním rozsahu m/z 150–1200.

5.3.2.2 Experimentální podmínky studia fundamentálních procesů v DESI-MS

Experimentální podmínky pro studium základních desorpčně ionizačních procesů v DESI-MS odpovídaly průtoku nebulizačního plynu dusíku na úrovni cca 2 l/min, vkládanému napětí na sprejer v hodnotě 5,5 kV a průtoku SK 8 μ l/min. Pracovní teplota kapiláry atmosférického vstupu MS byla nastavena na 200 °C a sprejovací kapalina byla tvořena methanolem.

Délka akvizice dat byla nastavována prostřednictvím MS softwaru Xcalibur 2.0.7 a pro každý experiment s rhodaminem B odpovídala 60 vteřinám. Měření probíhala v režimu detekce pozitivních iontů v hmotnostním rozsahu m/z 150–1200.

Experimenty související se studiem desorpčně ionizačních procesů nebyly provedeny pouze v DESI, ale také v doplňkovém experimentálním uspořádání bez vloženého vysokého napětí na sprejer, které je známé pod označením desorpčně extrakční elektrosprejová ionizace [12], a které bylo kromě absence VN, co do experimentálních parametrů totožné s DESI.

5.3.2.3 Podmínky měření biologických vzorků rostliny oměj šalamounek

V případě DESI-MS analýzy částí rostliny oměj šalamounek bylo základní nastavení průtoků sprejovací kapaliny (8 μ l/min), dusíku (60 arb resp. 2 l/min) a

hodnoty vloženého napětí (5,5 kV) na sprejeru totožné s optimalizovanými parametry použitými při analýze rhodaminu B. Zásadní rozdíl však byl ve složení sprejovací kapaliny, která odpovídala 50 % methanolu v MilliQ vodě s přídavkem 0,1 % kyseliny octové (V/V/V). Teplota kapiláry atmosférického vstupu MS byla nastavena na 275 °C.

V rámci každé analýzy vzorku oměje byla délka akvizice dat, zprostředkovaná pomocí MS softwaru Xcalibur 2.0.7, nastavena na 60 vteřin. Jednotlivá měření potom probíhala v pozitivním režimu v hmotnostním rozsahu m/z 150–1200.

5.4 MALDI-MSI

Technika MALDI-MSI byla v této práci použita k analýze kryomikrotomických řezů vzorků čmeláka zemního a k povrchové analýze vzorků much octomilek obecných. V případě čmeláka zemního byly experimenty provedeny prostřednictvím hmotnostního spektrometru ApexUltra FT-ICR (Bruker Daltonics, Německo) a Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Německo), zatímco vzorky octomilek obecných byly analyzovány pomocí přístroje MALDI Micro MX (Waters, UK).

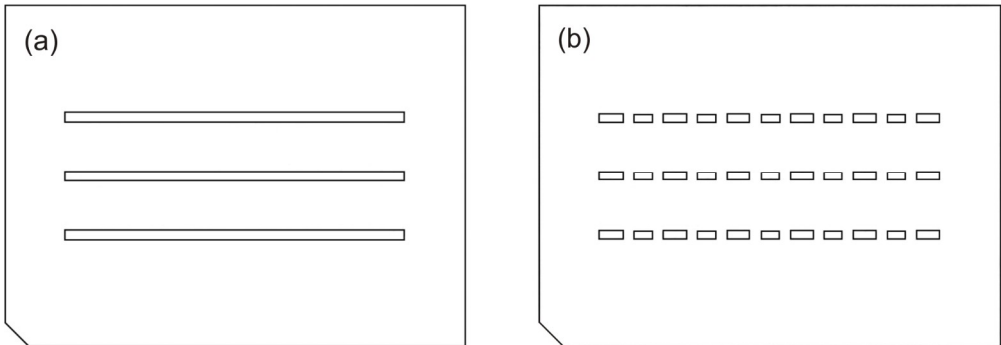
5.4.1 MALDI desky pro vzorky much octomilek obecných

Jedním z hlavních předpokladů úspěšného 2-D zobrazování 3-D biologického vzorku technikou MALDI-TOF je jeho správná fixace na MALDI vzorkovací destičce. Za tímto účelem, tj. pro analýzu povrchu much octomilek obecných, byly navrženy dva typy speciálních hliníkových destiček, každá o rozměrech odpovídajícím standardní komerční Waters MALDI destičce (55 x 41 x 2 mm).

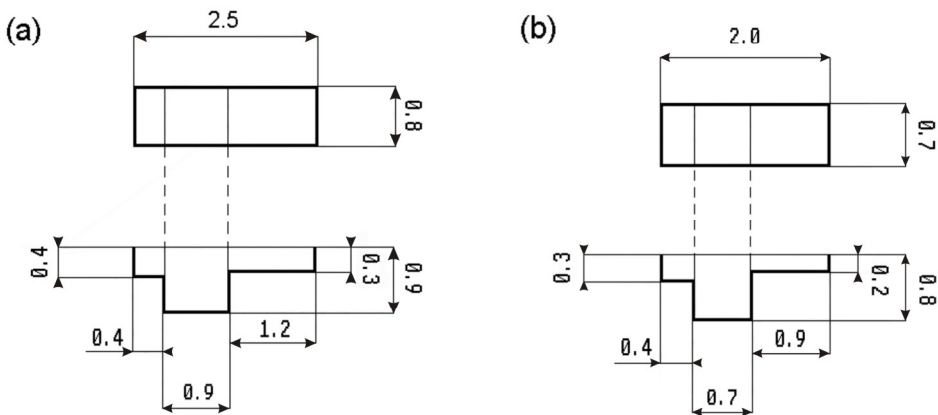
Vyvojově první typ MALDI destičky pro MSI vzorků much octomilek obecných obsahoval pouze jednoduchou 1 mm širokou a hlubokou drážku napříč hliníkovou destičkou (Obr. 5.9a).

V pořadí druhý navržený typ MALDI destičky již obsahoval komplexně profilované oddělené jamky pro samčí a samičí jedince octomilky obecné (Obr. 5.9b). Jednotlivé jamky přitom byly na hliníkové destičce zhotoveny pomocí ocelových

raznic, jejichž rozměry se odvíjely od průměrných rozměrů much octomilek ze souboru cca 50 jedinců pro každé pohlaví (Obr. 5.10). MALDI desky byly vyrobeny ve Vývojových dílnách ÚOCHB AV ČR, v.v.i.



Obř. 5.9 MALDI vzorkovací destičky. (a) Technický výkres MALDI vzorkovací destičky s jednoduchou 1 mm širokou a hlubokou drážkou. (b) Technický výkres MALDI vzorkovací destičky s profilovanými jamkami. Jamky jsou zleva do prava v pořadí samiči, samči, samiči atd.



Obř. 5.10 Individuální jamky pro vzorky much octomilek obecných na MALDI vzorkovací destičce. Veřkeré rozměry jsou uvedeny v milimetrech. (a) Technický výkres samičí jamky (půdorys a bokorys). (b) Technický výkres samčí jamky (půdorys a bokorys).

Vzorky much byly do jednoduchých drážek i do profilovaných jamek lepeny pomocí dvousložkového epoxidového lepidla (Hardman®, USA), které bylo vybráno

z důvodu minimální produkce matričních iontů a stejně tak díky vhodné době zpracovatelnosti a viskozitě. Pomocí epoxidového lepidla byla pokryta celá zobrazovaná oblast tj. okolí i vnitřní stěny drážek resp. jamek za účelem redukce iontů pozadí vzorkovací MALDI destičky.

5.4.2 Úprava vzorků tkání pro MALDI-MSI analýzy

Přístup MALDI-MSI byl využit v rámci dvou odlišně designovaných projektů zaměřených na analýzu biologických vzorků. V případě vzorků much octomilek obecných se jednalo o MSI intaktních dospělců, zatímco u čmeláka zemního byly analyzovány jeho kryomikrotomické řezy.

5.4.2.1 Příprava vzorků much octomilek obecných

Vzorky much octomilky obecné (Meigen, 1830, *Diptera, Drosophilidae*) kmene Canton-S. byly získány z kolonie založené na Max Planck Institutu pro chemickou ekologii v Německu v Jeně. Všechny mouchy, dospělci (samci i samice) byly 6 dní staré a každá z much byla chována samostatně v plastových mikrozkuřkách, a to 4 dny na standardním médiu a 2 dny pouze na cukrové vodě. V případě kopulace much byli samec a samice vloženy do jedné mikrozkuřky s tím, že byl celý průběh páření monitorován. Panenské i spárené mouchy byly před samotnou prací imobilizovány vložením do mrazáku při teplotě -20 °C.

Příprava vzorků po jejich vyjmutí z mrazáku spočívala v jejich ohřátí v uzavřené plastové mikrozkuřce na laboratorní teplotu. Následně byly mouchy fixovány na speciální MALDI vzorkovací destičku pomocí dvousložkového epoxidového lepidla (Hardman®, USA). MALDI destička s nalepenými mouchami byla poté umístěna do exsikátoru (oxid fosforečný, Sicapent®) bez vakua po dobu 6 hodin. Po tomto kroku byly mouchy zcela vysušeny a připraveny pro MSI experimenty.

V případě vzorků much octomilek obecných, které byly analyzovány metodou MALDI a nikoliv pouze v režimu LDI, bylo nutné na vzorky nanášet matici. Za tímto

účelem bylo jako matrice používáno lithné soli kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové (LiDHB). Tato matrice se specifikací pro analýzu v pozitivním režimu MALDI-MS [162] byla na vzorky nanášena pomocí komerční rozprašovací pistole (Harder & Steenbeck, Německo) s tryskou o vnitřním průměru 0,15 mm ze vzdálenosti přibližně 160 mm od vzorku. LiDHB matrice byla na vzorek aplikována v podobě roztoku v acetonu:dichlormethanu (9:1, V/V) v koncentraci 30 mg/ml. Nanášení matrice na vzorky much fixovaných na speciální MALDI vzorkovací destičce probíhalo formou přerušovaných kroků sprejování v intervalech 4 vteřin, které sloužily k dostatečnému odpaření rozpouštědla a zaschnutí vrstvy nanesené matrice. Na jednu sadu much na destičce bylo použito v průměru 2,5 ml roztoku matrice LiDHB, která byla na vzorky nanесena v počtu přibližně 100 vrstev.

5.4.2.2 Příprava vzorků čmeláka zemního

Vzorky samců čmeláka zemního (Linnaeus, 1758, *Hymenoptera*, *Apidae*) byly získány z kolonie založené v laboratoři ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Každý čmelák byl po dobu 5 dnů chován odděleně v průhledné plastové krabičce a byl krmen pomocí směsi pylu s medem a mateří kašičkou. Čmeláci byli následně imobilizováni vložením do mrazáku při teplotě -80 °C.

Vzorky čmeláka zemního byly analyzovány v režimu MSI v podobě jeho kryomikrotomických řezů. Samotnému řezání vzorků čmeláka však předcházelo několik kroků jeho přípravy, které spočívaly v naplnění jeho vzdušných vaků resp. celé vzdušnicové soustavy pomocí speciálního polymerního roztoku na bázi poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu] o molekulové hmotnosti 145 kDa [163].

Příprava vzorku čmeláka ke kryomikrotomickému řezání byla provedena z toho důvodu, že vzhledem k vzdušnicové soustavě v jeho těle a stejně tak kvůli přítomnosti tuhé kutikuly, prakticky nebylo možné získat kvalitní řez pro jeho MSI analýzu. Proto byl navržen jednoduchý, ale velice účinný postup přípravy vzorku pro kryomikrotomické řezání, který spočíval ve využití jemného vákua. Vzorek čmeláka byl nejprve zbaven nohou a křídel a následně byl takto upravený čmelák vložen do malé nádobky s připraveným vodným 15 % roztokem pHPMA. Čmelák byl v nádobce zajištěn tak, aby bylo celé jeho tělo ponořené v médiu. Nádobka se čmelákem byla

potom umístěna do exsikátoru připojeného na zdroj vakuu. Opakovaným vakuováním a zavzdušňováním exsikátoru došlo na základě rozdílů tlaků k nasávání fixačního média do těla čmeláka a k naplnění vzdušných vaků a pravděpodobně i prostor původně vyplněných hemolymfou (vzhledem k odstřiženým nohám a křídům). Odčerpávaný vzduch přítomný v těle čmeláka byl při experimentu pozorován v podobě unikajících vzduchových bublinek. Ve fázi skončení vyvíjení vzduchových bublinek bylo vakuum přerušeno. Celý proces vakuování byl opakován celkem třikrát, a jak již bylo zmíněno, vakuum bylo optimalizováno na velmi jemné z toho důvodu, aby nedošlo k výraznému poškození vnitřních orgánů těla čmeláka. Čmelák, který byl dokonale smáčený a vyplněný fixačním médiem byl v posledním kroku přípravy vložen do kalíšku z alobalu naplněného čistým 15 % (w/w) roztokem pHPMA. Díky tomu byl čmelák po zamrazení na -80 °C situován uprostřed zmrzlého bloku fixačního média, který jednak chránil jemné povrchové struktury čmeláka a stejně tak umožnil snadnou manipulaci a řezání těla.

Biologické vzorky čmeláka zemního byly řezány pomocí kryomikrotomu (CM1950, Leica, Německo) při teplotě -12 °C na řezy o tloušťce 12 µm. Jednotlivé řezy byly přeneseny na vodivá podložní skla (ITO) a při vakuu sušeny v exsikátoru po dobu 30 minut. Vzorky určené pro experimenty zaměřené na oblast vysokých molekulových hmotností byly před nanášením matrice omyty nejdříve pomocí 70 % a následně 90 % ethanolem v intervalech v délce 30 vteřin. Pro analýzu vzorků řezů čmeláka zemního byly použity dva druhy matrice v závislosti na oblasti sledovaných hmotností. Pro MSI experimenty v oblasti nízkých hmotností byla použita matrice CHCA (7 mg/ml v 50 % acetonitrilu, 0,2 % TFA) a pro oblast vysokých molekulových hmotností SA (10 mg/ml v 60 % acetonitrilu, 0,2 % TFA). Matrice byly nanášeny pomocí zařízení ImagePrep (Bruker Daltonics, Německo).

5.4.3 Podmínky měření pro MALDI-MSI

Optimalizace experimentálních podmínek projektů MALDI-MSI intaktních jedinců octomilek obecných a kryomikrotomických řezů čmeláka zemního na sobě probíhala zcela nezávisle. A to nejen díky rozdílům v použité instrumentaci, ale především díky zcela odlišnému konceptu těchto projektů.

5.4.3.1 Podmínky měření LDI/MALDI-MSI octomilek obecných

MALDI-MSI analýzy vzorků much octomilek obecných byly provedeny v reflektrotronovém režimu TOF analyzátoru s urychlujícím napětím -12 kV resp. 5 kV. Zpoždění extrakce bylo 500 ns, přičemž ionizace a desorpce byla realizována pomocí dusíkového UV laseru (337 nm, 4 ns pulz při maximu 320 μJ a frekvenci 20 Hz). Matriční ionty byly potlačeny na úrovni nízkých hmotností do 150 Da. Kompletně vysušené a maticí pokryté vzorky much fixované na MALDI vzorkovací destičce (viz kapitola 5.4.1) byly zobrazovány rastrem o velikosti kroku 100 μm . Počet laserových pulzů na jeden bod byl optimalizovaný a nastavený na 50 (128 μJ /pulz). Hmotnostní rozsah měření odpovídal m/z 100–1000.

Data byla sbírána pomocí softwaru MassLynx 4.0 (Waters, UK) a zpracována na zakázku vyrobeným softwarem MALDI Image Converter (Waters, UK) za účelem získání prostorově rozlišených dat. Tato data byla následně exportována do softwaru BioMap (Novartis, Switzerland) a konvertována na 2-D mapu intenzit iontů.

5.4.3.2 Podmínky měření MALDI-MSI čmeláka zemního

MALDI-MSI analýzy kryomikrotomických řezů čmeláka zemního byly realizovány prostřednictvím dvou hmotnostních spektrometrů vzhledem k analýze oblasti nízkých a vysokých hmotností. Oblast nízkých hmotností odpovídala rozsahu m/z 450–1000 a byla provedena na přístroji APEX Ultra 9.4 T FT-ICR MS (Bruker Daltonics, Německo) vybaveným duálním iontovým zdrojem Apollo II ESI/MALDI. Oblast vysokých hmotností potom korespondovala s rozsahem m/z 2000–18000 a byla změřena na přístroji MALDI-TOF/TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics, Německo) pracujícím se systémem SmartBeam na platformě UV laseru.

Kryomikrotomické řezy čmeláka byly v případě experimentů v oblasti nízkých hmotností analyzovány rastrem s velikostí kroku 150 μm , přičemž počet laserových pulzů na jeden bod byl optimalizovaný na 400. MSI experimenty v oblasti vysokých molekulových hmotností byly provedeny se stejným rozlišením kroku rastru 150 μm a s počtem 300 laserových pulzů na každý bod. Veškerá naměřená data byla zpracována a vyhodnocena pomocí softwaru FlexImaging (Bruker Daltonics, Německo).

5.5 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS) bylo v této práci využito jako nezávislé metody pro identifikaci látek, jejichž distribuce na povrchu vzorků much octomilek obecných byla získána na základě MALDI-MSI experimentů. Měření byla provedena na přístroji MS02 Micromass MasSpec (Micromass, UK) se sektorovým analyzátozem s dvojí fokusací (geometrie EBE) s elektronovou inizací (EI) při 70 eV, který byl připojen k plynovému chromatografu HP 6890 (Agilent, USA).

5.5.1 Příprava vzorků pro GC/MS

Přístupu GC/MS bylo využito pro analýzu vzorků dvou typů hexanových extraktů panenských dospělců (6 dních starých) much octomilek obecných. Hexanové extrakty křídel a zadečku much byly získány na základě dvou různých postupů přípravy.

V případě hexanových extraktů křídel bylo pro jeden vzorek použito 10 párů samičích křídel, která byla ustříhnuta těsně u hrudi much tj. u báze s ohledem na minimalizaci jakéhokoli jiného poškození jejich tkáně. Takto získaná křídla byla vložena do skleněného insertu a převrstvena 40 μ l hexanu. Po 5 minutách extrakce, která probíhala při laboratorní teplotě, bylo ke směsi v insertu přidáno 20 μ l roztoku uhlovodíku C_{16} v hexanu o koncentraci 25 ng/ml jako vnitřního standardu. Vnitřní standard v podobě C_{16} byl vybrán na základě předchozích experimentů, které potvrdily, že v extraktech není přirozeně zastoupený. Insert s extraktem byl následně centrifugován při teplotě 4 °C, 10000 rpm po dobu 4 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán skleněnou kapilárou a vložen do nového insertu, z kterého bylo následně pomocí argonu odpařeno veškeré rozpouštědlo.

Příprava hexanových extraktů abdominálních částí much spočívala, na rozdíl od extraktu křídel, v cíleném otěru kutikulární vrstvy lipidů z abdominální oblasti panenských samců a samic octomilek obecných. K danému experimentu bylo vybráno celkem 14 dospělců od každého pohlaví. K otěru bylo použito savého papíru, který byl předem extrahovaný v hexanu, a který byl nůžkami nastříhán na malé kousky (1 mm x 2 mm). Pomocí pinzety byl daný kousek extrahovaného papíru nejprve namočen do

hexanu a následně s ním byla opatrně otřena abdominální oblast a oblast genitálií. Postup byl pro každého jedince opakován celkem dvakrát, a to pokaždé s novým kouskem papíru. Takto získané papírky obsahující extrakt kutikulárních lipidů byly sbírány do skleněných insertů, a to zvlášť pro každé pohlaví. Následně bylo do insertů přidáno 40 µl hexanu a jednotlivé vzorky byly zpracovány shodným postupem jako v případě výše uvedeného extraktu z křídel much.

Takto připravené vzorky extraktů byly v insertu vloženy do skleněné vialky a byly zamrazeny na -20 °C.

5.5.2 Podmínky měření GC/MS

Připravené vzorky extraktů z křídel a zadečků byly rekonstituovány ve 40 µl hexanu. GC/MS experimenty v pozitivním režimu byly provedeny na plynovém chromatografu HP6890 (Agilent, USA) vybaveného kolonou ZB5mx (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm tenkým vnitřním filmem stacionární fáze, Phenomenex, USA). Teplota nástřikové komory byla nastavena na 220 °C a injektor pracoval v splitless režimu při nástřiku 1 µl vzorku. Jako nosný plyn bylo použito helium při konstantním průtoku 1 ml/min. Použitý teplotní program byl následující: 100 °C (2 min.), nárůst teploty rychlostí 15 °C/min až k dosažení hodnoty 230 °C, dále byla teplota zvyšována rychlostí 5 °C/min až do 280 °C, v závěrečné fázi teplotního profilu byla teplota udržována na 300 °C (3 min.).

MS detekce na přístroji MS02 Micromass MasSpec (Micromass, UK) se sektorovým analyzátozem byla provedena v hmotnostním rozsahu měření m/z 50–500 při rychlosti 1,7 s/scan. Magnetické pole analyzátoru odpovídalo síle 0,8 T.

5.6 Software použitý pro akvizici a vyhodnocování MS dat

Ve spojení s instrumentací MALDI Micro MX (Waters, UK) byla měřená data sbírána v režimu MSI prostřednictvím softwaru MassLynx 4.0 (Waters, UK). Získaná surová data byla před vlastním vyhodnocováním zpracována do prostorově rozlišených dat s pomocí na zakázku vyrobeným softwarem MALDI Image Converter (Waters,

UK), čímž byla převedena na formát .IMG. Data zpracována do .IMG formátu byla dále importována softwarem BioMap (Novartis, Švýcarsko) a konvertována na 2-D mapu intenzit iontů. Program BioMap umožnil získat z každého bodu zobrazované oblasti vzorku MS spektrum v rozsahu přednastavené minimální a maximální hodnoty MS. Zpracováním vybraného úseku hmotnostního spektra resp. jednoho zvoleného píku tak byla získána 2-D distribuce daného analytu v celé zobrazované oblasti vzorku.

V případě experimentů s hmotnostním spektrometrem ApexUltra FT-ICR (Bruker Daltonics, Německo) a Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Německo) probíhala akvizice a vyhodnocování dat na platformě softwaru FlexImaging (Bruker Daltonics, Německo). Pomocí uživatelského rozhraní softwaru FlexImaging byla naměřená surová data konvertována do dat prostorově rozlišených. Tato data byla následně pomocí programu FlexImaging přiřazena na úrovni 2-D distribuce k optickému obrazu (formátu .TIFF) analyzovaného vzorku. Pomocí programu FlexImaging a jeho doplňků bylo možné označením vybraného píku v MS spektru zobrazit danou hodnotu m/z v celé skenované oblasti vzorku a kromě toho program umožňoval danou 2-D distribuci vybrané m/z přiřadit k optickému obrazu a vizualizovat ji na základě zvolených parametrů v různých variantách. V případě FlexImaging softwaru, stejně jako u MALDI Image Converteru byla všechna naměřená data převedena na jedno zprůměrované hmotnostní spektrum.

V rámci analýz probíhajících na hmotnostních spektrometrech LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, USA) a LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA) byly parametry měření a akvizice dat v režimu MS uskutečněny pomocí softwaru Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific, USA). Vyhodnocování dat (formátu .raw) bylo provedeno opět na platformě softwaru Xcalibur 2.0.7 v záložce Qual Browser. V případě experimentů s motorizovaným DESI zdrojem umožňujícím analýzu vzorků v režimu 1-D resp. 2-D probíhalo nastavování parametrů a akvizice dat prostřednictvím softwaru, který byl vytvořený ve Vývojových dílnách ÚOCHB AV ČR, v.v.i. pod označením Xcalibur Scanner ver.1.0.1. (kap. 5.1.1).

5.7 Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) bylo v této práci využito ke studiu morfologie povrchových struktur na vzorkovacích destičkách při DESI-MS experimentech s nanočásticemi a dále ke studiu morfologie biologických vzorků a homogenity nanosené vrstvy matrice v případě MALDI-MSI analýz.

Vzorky pro studium fundamentálních procesů DESI byly na příslušných destičkách ze skla respektive porézního teflonu vysušeny za laboratorní teploty a následně pokryty 30 nm silnou vrstvou zlata pomocí naprašovacího přístroje Polaron E5100 (Quorum Technologies Ltd, UK). Vzorky byly analyzovány pomocí elektronového skenovacího mikroskopu typu Aquasem (Tescan, Česká republika) při urychlujícím napětí 15 kV s použitím detektoru sekundárních elektronů. Snímky byly pro každý vzorek pořizovány při zvětšení 80x, 150x, 500x, 1000x a 1500x.

Morfologie vzorků much octomilky obecné a stejně tak homogenita nanosené vrstvy matrice na těchto vzorcích byla studována pomocí SEM na přístroji JSM-6380LV (JEOL, Japan). Vzorky much umístěných na hliníkových MALDI vzorkovacích destičkách s komplexně profilovanými jamkami pro samce a samice byly pokryty několik nanometrů silnou vrstvou zlata pomocí naprašovacího zařízení SCD 050 (Bal-Tec, Liechtenstein). MALDI desky obsahující pozlacené vzorky much pak byly pomocí oboustranné vodivé uhlíkové lepicí pásky (Ted Pella, USA) fixovány na 3-D držák v kaverně SEM. Snímky byly pořizeny při urychlujícím napětí 12 kV a průměru svazku elektronů 45 μm .

5.8 Chemikálie a laboratorní pomůcky

Chemikálie a biologické vzorky

Aceton pro HPLC (Sigma-Aldrich, Německo), acetonitril LiChrosolv pro LC-MS (Merck, Německo), dichlormethan Rotisolv HPLC (Carl Roth, Německo), ethanol LiChrosolv pro LC-MS (Merck, Německo), chloroform pro HPLC (Sigma-Aldrich, Německo), n-hexan Rotisolv $\geq 99,9\%$ (Carl Roth, Německo), methanol supra-gradient pro HPLC (Scharlab S. L., Španělsko), methanol pro HPLC (Sigma-Aldrich,

Německo), methyl-*terc*-butyl ether Chromasolv Plus pro HPLC 99,9 % (Sigma-Aldrich, Česká republika), toluen Chromasolv Plus pro HPLC $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich, Česká republika), polyethelynglykolové oligomery p.a. (PEG - 200 Da, 300 Da, 600 Da a 1000 Da) (Sigma-Aldrich, Německo), analytický standard hexadekanu (Sigma-Aldrich, Německo), voda Milli-Q (Merck Millipore, USA), kyselina 2,5-dihydroxybenzoová 98 % (Sigma-Aldrich, Německo), kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová pro MALDI-MS (Bruker Daltonics, Německo), kyselina octová 99,99 %+, glacial (Sigma-Aldrich, Česká republika), kyselina sinapová pro MALDI-MS (Bruker Daltonics, Německo), kyselina trifluoroctová Chromasolv pro HPLC $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich, Česká republika), 2,3-diaminopyridin ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, Česká republika), akonitin ≥ 95 % (Sigma-Aldrich, Česká republika), hydroxid draselný (Sigma-Aldrich, Německo), melamin $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich, Česká republika), oxid fosforečný (Sigma-Aldrich, Německo), uhličitan lithný p.a. (Fluka, Česká republika), MALDI matrice LiDHB byla syntetizována dle postupu uvedeného v publikaci Cvačka *et al.* [161], příprava polymeru na bázi pHPMA probíhala dle postupu uvedeného v publikaci Strohalm *et al.* [162], Fe₃O₄ nanočástice (Ústav Anorganické chemie AV ČR, v.v.i., Česká republika).

Vzorky novorozeneckého mázku byly získány v rámci spolupráce s Gynekologicko-porodnickou klinikou 1. LF UK a VFN. Vzorky much octomilek obecných pocházely z chovu založeného na MPI-CE v Německu v Jeně. Vzorky čmeláka zemního byly získány prostřednictvím ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Rostliny oměj šalamounek byly zakoupeny v zahrádkářství v Praze. Mléka a smetany byly zakoupeny v obchodě s potravinami.

Laboratorní materiál a přístroje

Hmotnostní spektrometr APEX Ultra 9.4 T FTICR MS (Bruker Daltonics, Německo), hmotnostní spektrometr LCQ Fleet (Thermo Fischer Scientific, USA), hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA), hmotnostní spektrometr MALDI Micro MX (Waters, UK), hmotnostní spektrometr MS02 Micromass MassSpec (Micromass, UK), hmotnostní spektrometr Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Německo), plynový chromatograf HP 6890 (Agilent, USA), aplikátor MALDI matrice ImagePrep (Bruker Daltonics, Německo),

kryomikrotom CM1950 (Leica, Německo), rozprašovací pistole GRAFO T1 (Harder & Steenbeck, Německo), rastrovací elektronový mikroskop JSM-6380LV (JEOL, Japonsko), rastrovací elektronový mikroskop Aquasem (Tescan, Česká republika), naprašovacího přístroj SCD 050 (Bal-Tec, Lichnštejnsko), naprašovací přístroj Polaron E5100 (Quorum Technologies, UK), analytické váhy ABJ 220-4M (KERN, Německo), analytické váhy AG285 (Mettler Toledo, USA), binokulární mikroskop Stemi DV4 (Zeiss, Německo), laboratorní centrifuga 5417R (Eppendorf AG, Německo), vortex PV-1 (Grant-bio, USA), vortex Genie 1 (Scientific Industries, USA), laboratorní sonikátor USR 30-H (Merck Eurolab N. V., Německo), laboratorní sonikátor RK100H (Sonorex, Německo), externí laboratorní zdroj IPS-603 (ISO-TECH, UK), externí laboratorní zdroj ALU 210 (ZPA KOŠÍŘE - Závody Děčín, Česká republika), externí stříkačková pumpa Harvard 11 Plus (Harvard Apparatus, USA), UV lampa (Heraeus Noblelight, USA), MX10R mikromanipulátor (Siskiyou Corporation, USA), ocelové MALDI vzorkovací destičky (Waters, UK), na zakázku vyrobené hliníkové MALDI vzorkovací destičky (ÚOCHB AV ČR, v.v.i.), porézní PTFE I (Fluoro-Plastics, USA), porézní PTFE II (Small parts, USA), vodivá podložní sklíčka ITO (Bruker Daltonics, Německo), podložní mikroskopická sklíčka (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs, Německo), desky pro tenkovrstvou chromatografii 02599 Fluka (Sigma-Aldrich, Česká republika), PEEK kapiláry (Thermo Fisher Scientific, USA), HPLC spojka T-tvaru, rovné spojky, šroubení, teflonové kapiláry (Upchurch Scientific, USA), sada laboratorních pipet (Eppendorf, Německo), jednorázové plastové špičky pro pipetování (VWR, Německo), skleněná stříkačka (Hamilton, USA), skleněné vialky a inserty (VWR, Německo), plastové mikrozkuhavky typu Eppendorf (Eppendorf, Německo), skleněné pipety dle Pasteura (Sigma-Aldrich, Německo), laboratorní skleněný exsikátor (Duran Group, Německo), pinzety typu Dumont (Fine Science Tools, USA), epoxidové lepidlo (Hardman, USA), pružinové nůžky Moria (Fine Science Tools, USA), kovové laboratorní pinzety (Bernstein, Německo), uhlíková lepicí páska (Ted Pella, USA), hliníková folie (Carl Roth, Německo), permanentní fix Sharpie (Sharpie, USA).

K vypracování disertační práce bylo dále použito běžného laboratorního skla a základních laboratorních pomůcek.

6. VÝSLEDKY A DISKUSE

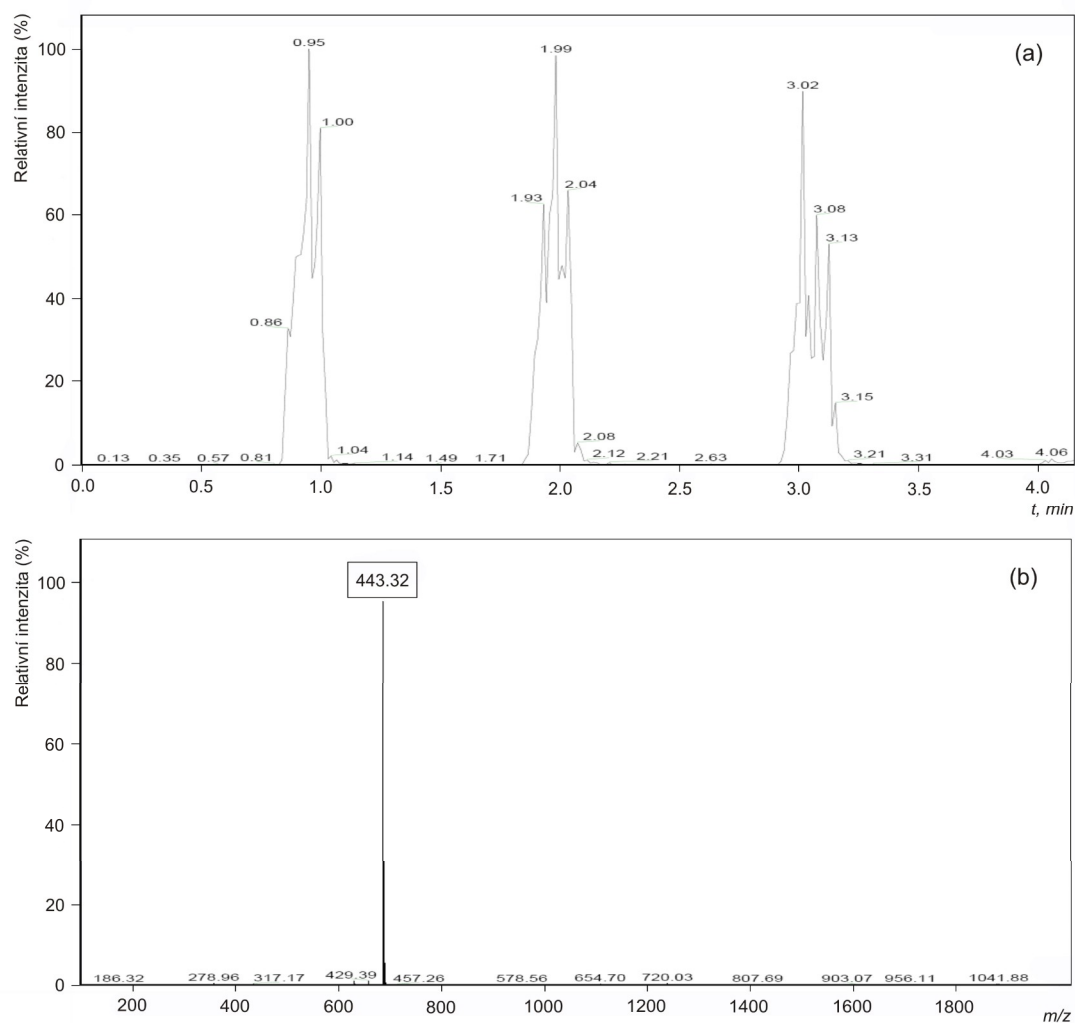
6.1 Konstrukce, testování a optimalizace AIT platformy pro DESI/DAPPI-MS

6.1.1 Testování AIT platformy na základě DESI-MS rhodaminu B

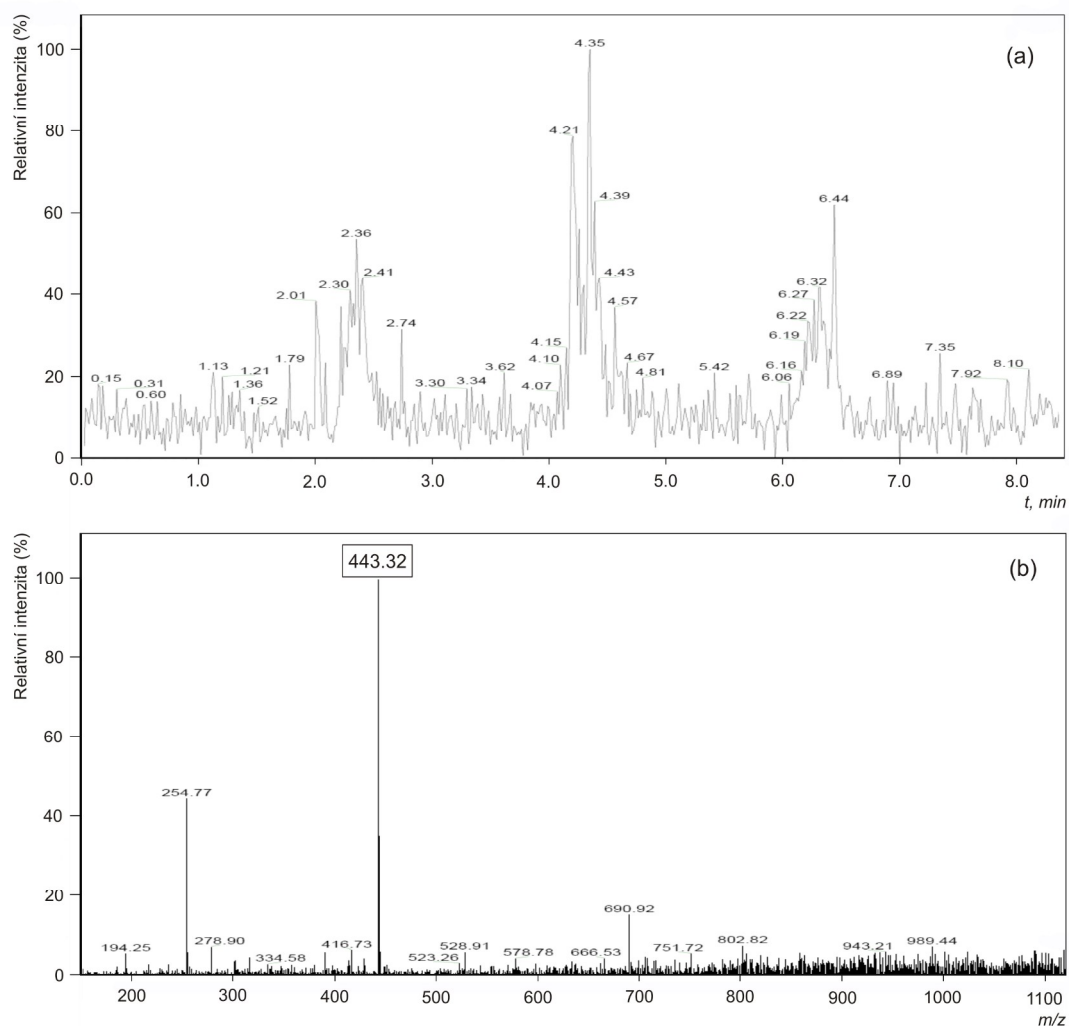
Rhodaminu B bylo s úspěchem využito k porovnávání různých typů vzorkovacích povrchů za účelem zjištění jejich vlastností v souvislosti se získanou intenzitou signálu odpovídajícího molekulám ionizovaného analytu a zároveň se stabilitou signálu vzhledem k rychlosti odmyváání analytu ze vzorkovacího povrchu. Za tímto účelem byly provedeny identické experimenty se vzorkovacími povrchy PTFE 1, PTFE 2, sklem a TLC deskou.

Na Obr. 6.1 je znázorněno MS spektrum a časový záznam analýzy rhodaminu B nanášeného pomocí Sharpie fixu na PTFE 2 vzorkovací povrch v podobě tří identických linek od sebe vzdálených 1 cm, které byly analyzovány napříč vzorkovacím povrchem. Z časového záznamu analýzy jsou patrné, ve zvoleném hmotnostním rozsahu odpovídajícímu m/z 443 – 443,5, tři dominantní signály, které korespondují tloušťce každé ze třech linek rhodaminu B. Rhodamin B byl ve formě aduktu $[M+H]^+$ pozorován na m/z 443,3. Shodně designovaný experiment byl provedený na TLC povrchu, a to konkrétně na TLC deskách s nemodifikovaným silikagelem na hliníkové fólii (02599 Fluka – Sigma-Aldrich, Česká republika) viz Obr. 6.2.

Na základě porovnání experimentů s nanášením rhodaminu B prostřednictvím fixu Sharpie na PTFE 2 a TLC vzorkovací povrch vyplynulo, že v případě TLC desky oproti PTFE 2 povrchu dochází k relativně velkému potlačení signálu rhodaminu B (z absolutních intenzit 1×10^6 na 1×10^3), a to především kvůli odlišné morfologii TLC povrchu, který umožňoval pronikání nanášeného analytu rhodaminu B hluboko do vrstvy silikagelu. Analyt byl kromě toho na silikagel silně adsorbován. Dalším faktorem negativně ovlivňujícím intenzitu signálu rhodaminu B byla kompetice ionizace molekul rhodaminu B s kontaminanty přítomnými ve vrstvě silikagelu, což bylo demonstrováno přítomností signálů m/z 254,8 a m/z 690,9 ve spektru na Obr. 6.2b.



Obr. 6.1 DESI-MS analýza rhodaminu B naneseného prostřednictvím fixu Sharpie ve třech identických linkách na PTFE 2 vzorkovací povrch. (a) Časový záznam analýzy zobrazující tři dominantní signály odpovídající třem napříč analyzovaným linkám rhodaminu B. (b) Spektrum s majoritním píkem rhodaminu B m/z 443,3.



Obr. 6.2 DESI-MS analýza rhodaminu B naneseného prostřednictvím fixu Sharpie ve třech identických linkách na TLC vzorkovací povrch. (a) Časový záznam analýzy zobrazující tři dominantní signály odpovídající třem napříč analyzovaným linkám rhodaminu B. (b) Spektrum s majoritním píkem rhodaminu B m/z 443,3.

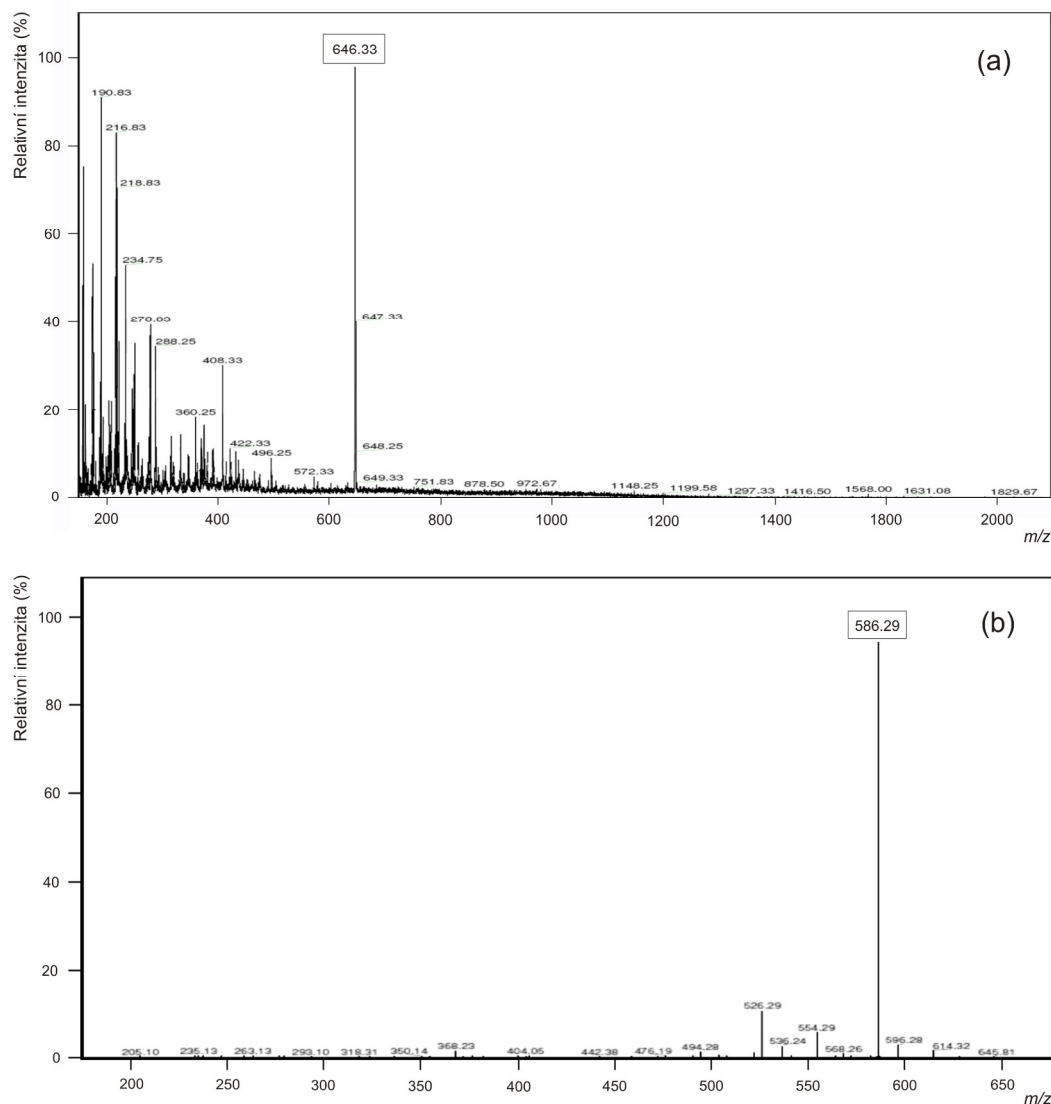
6.1.2 Testování AIT platformy prostřednictvím DESI-MS rostliny oměj šalamounek

V rámci testování AIT platformy i z hlediska definování aplikačního rozsahu zkonstruovaného DESI ionizačního zdroje, byla provedena série analýz biologických vzorků částí rostliny oměj šalamounek. Experimenty byly zaměřeny na analýzu diterpenického alkaloidu akonitinu.

Vzorky tvořené sušeným kořenem, listy a semeny byly pomocí oboustranné lepicí pásky fixovány na vzorkovacím stolku AIT platformy a podrobeny DESI-MS resp. DESI-MS/MS analýze v pozitivním režimu analyzovaných iontů.

Na Obr. 6.3a je zobrazeno typické hmotnostní spektrum získané při DESI-MS experimentu sušeného kořene rostliny oměje šalamounek při použití SK s průtokem 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ o složení 50 % methanolu v MilliQ vodě s 0,1 % přídavkem kyseliny octové (V/V/V). Akonitin byl ve spektrech přítomný v podobě iontu m/z 646,3 který odpovídal aduktu $[\text{M}+\text{H}]^+$ [163,164]. Při kolizně indukované disociaci iontu m/z 646,3 byla získána fragmentační spektra s majoritním fragmentačním iontem s hmotností m/z 586,2 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{COOH}]^+$, který vznikl ztrátou kyseliny octové. Získaná fragmentační spektra byla v souladu s výsledky ESI-MS/MS analýzy akonitinu prezentovanými v publikaci Sun *et al.* z roku 2004 [163]. DESI-MS/MS fragmentační spektra akonitinu získaná analýzou částí rostlin (Obr. 6.3b) byla dále za účelem podpoření naměřených dat porovnána s hmotnostními spektry standardu akonitinu.

Pomocí techniky DESI-MS s využitím univerzální platformy pro AIT se podařilo analyzovat akonitin z biologických vzorků různých částí rostliny oměj šalamounek s tím, že nejintenzivnější signály odpovídající akonitinu byly získány z kořene resp. hlízy rostliny. Takto naměřená hmotnostní spektra byla porovnána se spektry získanými za shodných experimentálních podmínek DESI-MS analýzou standardu akonitinu, na základě čehož byl akonitin ve vzorcích rostlin identifikován.

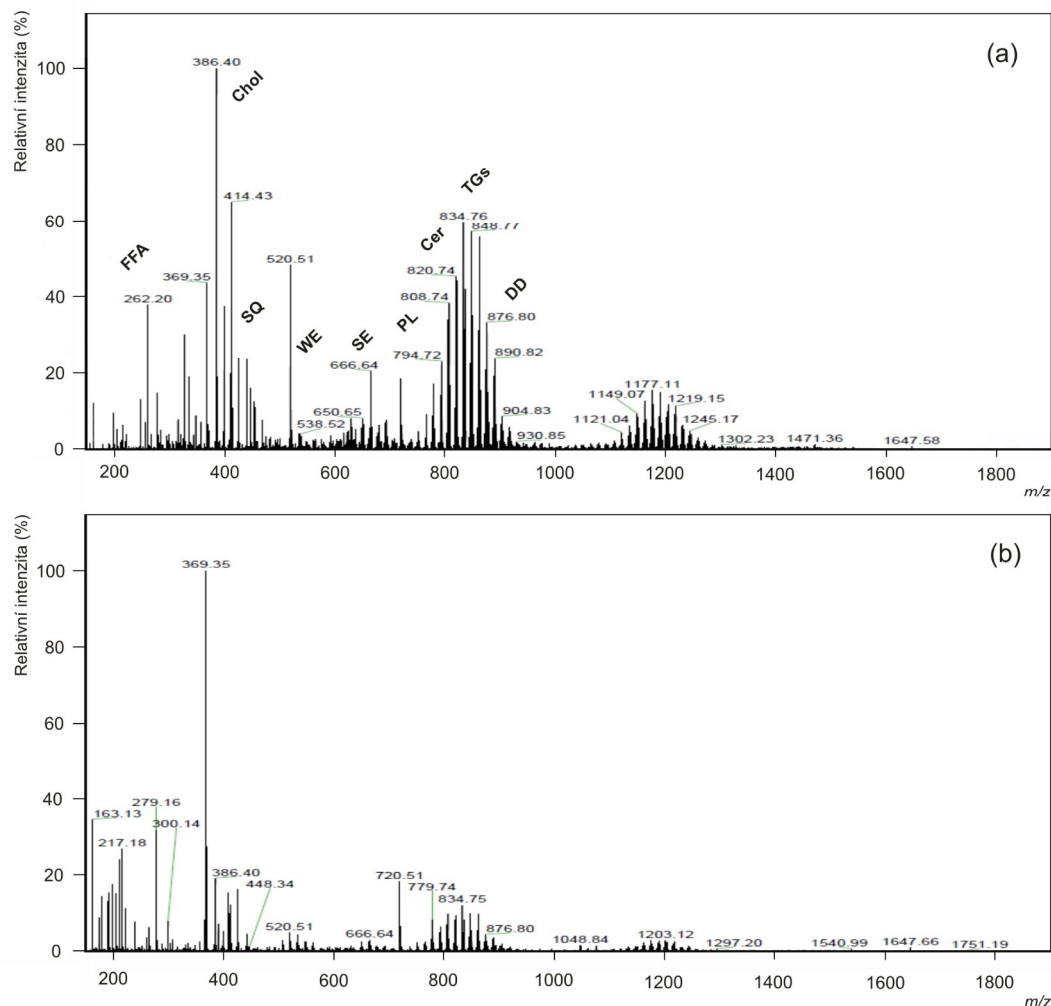


Obr. 6.3 DESI-MS a DESI-MS/MS analýza vzorků kořene rostliny oměj šalamounek. (a) DESI-MS spektrum zobrazující majoritní pík m/z 646,3 odpovídající aduktu akonitinu $[M+H]^+$. (b) DESI-MS/MS fragmentační spektrum iontu m/z 646,3 s dominantním fragmentačním píkem m/z 586,2 $[M+H-CH_3COOH]^+$.

6.1.3 Testování AIT platformy na základě DAPPI-MS novorozeneckého mázku

Testování univerzálnosti zkonstruované platformy pro AIT probíhalo kromě režimu DESI-MS i v uspořádání s DAPPI ionizačním zdrojem.

Na Obr. 6.4a je zobrazeno typické hmotnostní spektrum získané při DAPPI-MS analýze vernixu extrahovaného metodou MTBA. Obdobně je na Obr. 6.4b zobrazeno spektrum vernixu extrahovaného postupem FOLCH.



Obr. 6.4 DAPPI-MS analýza vzorků extraktů novorozeneckého mázku. (a) Typické DAPPI-MS spektrum analýzy extraktu vernixu získaného metodou MTBA s vyznačenými lokacemi identifikovaných skupin lipidů. (b) Typické DAPPI-MS spektrum analýzy extraktu vernixu získaného metodou FOLCH s vyznačenými lokacemi identifikovaných skupin lipidů.

Při porovnání těchto dvou typických spekter resp. při porovnání daných extrakčních metod je patrné, že v případě vzorků MTBE byla prostřednictvím DAPPI-MS získána spektra se zastoupením více skupin lipidů než jak tomu bylo u spekter získaných za shodných experimentálních podmínek ze vzorků FOLCH. Jednotlivé třídy lipidů byly k oblastem naměřených signálů přiřazeny na základě přesné hmoty.

V případě DAPPI-MS analýzy vzorků MTBE bylo kromě toho dosaženo vyšší absolutní intenzity signálů, a to orientačně na úrovni 1×10^6 oproti hodnotám 1×10^5 v případě vzorků FOLCH.

Na základě analýz extrahovaného vernixu byla potvrzena vhodnost konstrukčního řešení univerzální platformy pro DAPPI-MS experimenty. Stejně tak bylo při porovnání výsledků analýz vzorků vernixu získaných na základě dvou různých extrakčních metod zjištěno, že metoda MTBE na rozdíl od metody FOLCH poskytuje bohatší a kvalitnější DAPPI spektra, co do zastoupení iontů lipidů.

6.2 Studium procesů desorpce/ionizace v DESI-MS

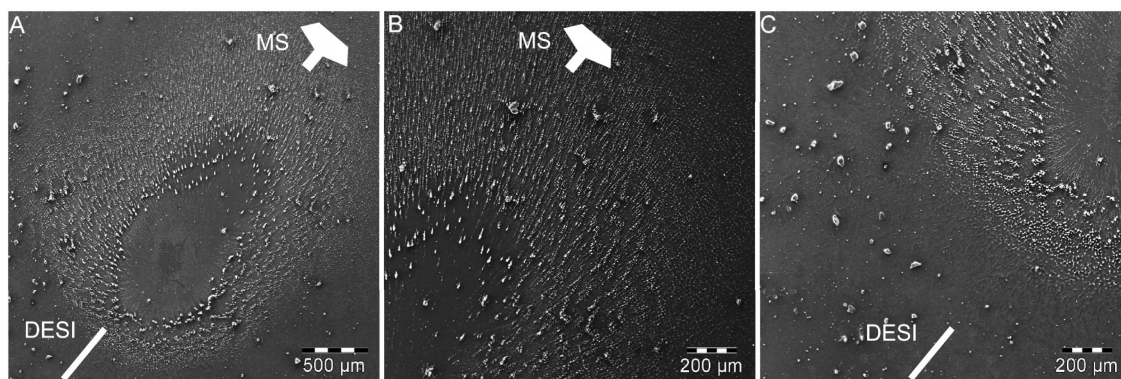
Studie desorpčně ionizačních procesů, která je prezentována v této disertační práci byla zaměřena na testování robustnosti „Droplet pick up“ mechanismu, a to prostřednictvím povrchových struktur [69], k jejichž vzniku dochází na vzorkovacím povrchu s naneseným analytem během DESI-MS analýz. K objasnění vzniku a vlastností těchto povrchových formací bylo využito detailních SEM snímků, feromagnetických nanočástic přidávaných do SK ve formě koloidního roztoku a různých experimentálních podmínek včetně různých typů vzorkovacích povrchů.

Délka akvizice dat byla pro každý experiment nastavena na 60 vteřin, což byl experimentálně optimalizovaný interval dostačující k tomu, aby byl modelový analyt rhodamin B odplaven z místa jeho nanesení na vzorkovacím povrchu.

Na Obr. 6.5 jsou zobrazeny SEM snímky skleněného povrchu s naneseným rhodaminem B, které byly získány v rámci experimentu, při kterém byl použitý methanol jako SK. Obr. 6.5A zachycuje celou formaci tvořenou krystalky analytu, která je, jak lze ze snímku vypožorovat, tvořena pravidelně uskupenými a opakujícími se prvky, které jsou svým tvarem podobné potokům. Na Obr. 6.5A je stejně tak patrné, že z centrální oblasti formace je směrem ke krajům odplaven veškerý analyt. Na základě Obr. 6.5A bylo dále zjištěno, že dané formace jsou svým vyústěním orientované vždy směrem k atmosférickému vstupu MS tj. ve směru hlavního proudu DESI spreje.

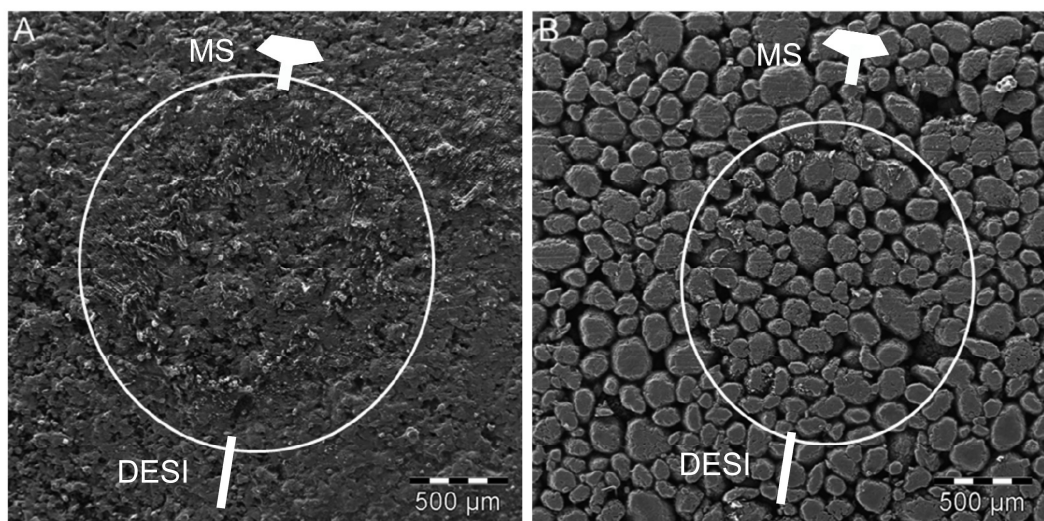
Existence popisovaných struktur byla poprvé zjištěna na základě jejich fluorescenční detekce [69], která ovšem vykazovala relativně nízké rozlišení. Za

účelem zvýšení rozlišení proto bylo ve zde prezentované studii využito SEM, díky čemuž byly poprvé získány detaily struktur a jejich přesné tvary. Jak je možné vidět na detailním zobrazení struktur na Obr. 6.5B a Obr. 6.5C, vzniklé potoky probíhající celou formací jsou vždy do určité míry zakřivené, což se nejvíce projevuje v horní části struktury tj. v oblasti nejvíce vzdálené vůči MS atmosférickému vstupu. Jak je patrné z Obr. 6.5C prvky povrchové formace podobné potokům jsou podrobeny efektu, na základě kterého dochází ke změně jejich původní trajektorie, směřované kolmo na centrální oblast, ve směr orientovaný na hlavní proud DESI spreje.



Obr. 6.5 SEM snímky zobrazující povrchové formace vznikající při dopadu kapiček DESI sprejeru na skleněný povrch s naneseným analytem rhodaminem B. (A) Pohled na celý tvar, charakter a orientaci formace. (B) Detail horní části formace. (C) Detail spodní části formace.

Podobné efekty povrchových formací byly pozorovány i na PTFE površích (Obr. 6.6), bohužel dané formace jsou v případě PTFE experimentů hůře viditelné, než jak tomu bylo na skle, protože díky morfologii PTFE povrchu docházelo k výrazné ztrátě kontrastu při SEM snímkování.

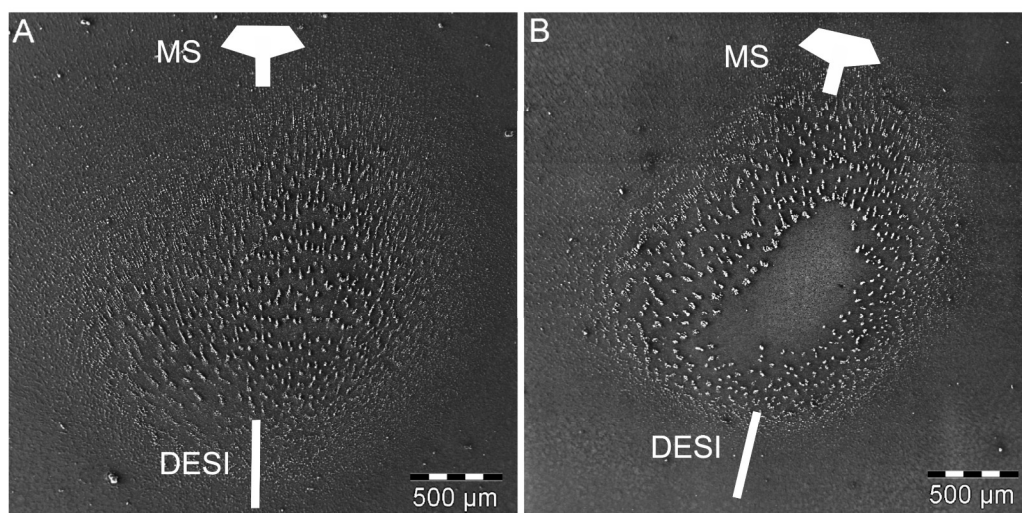


Obr. 6.6 SEM snímky zobrazující povrchové formace vznikající při dopadu kapiček DESI sprejeru na porézní PTFE povrchy s naneseným analytem rhodaminem B. Bílým oválem je vyznačená oblast odpovídající místu dopadu primárních kapiček DESI spreje. Vzniklé povrchové formace na PTFE jsou koncentrické s vloženým oválem. (A) PTFE I. (B) PTFE II.

Za účelem dalšího studia povrchových formací byly do SK přidány feromagnetické nanočástice. Nanočástice byly aplikovány ve formě koloidního roztoku do primární SK tvořené methanolem. Vzhledem k přítomnosti nanočástic v DESI spreji bylo predikováno odlišné chování vznikajících kapiček spreje, než jak je tomu u klasického DESI experimentu, během kterého dochází k významné redukci objemu primárních kapiček spreje na základě odpařování rozpouštědla, Columbické exploze a kolize kapiček s povrchem. V případě DESI spreje obsahujícího nanočástice byl pozorován zcela opačný trend v podobě agregace kapiček tj. zvětšování jejich objemu. Vzhledem k tomu, že použité nanočástice byly feromagnetické, tak bylo možné s pomocí běžného permanentního magnetu ovlivňovat jejich distribuci na vzorkovacích površích, a to jednoduchým přiložením slabého permanentního magnetu z opačné strany povrchu vzhledem k dopadajícím kapičkám spreje. Na základě těchto skutečností byly designovány dva typy jednoduchých experimentů. Při prvním z nich byl během DESI analýzy pod oblastí analytu rhodaminu B naneseného na skleněném povrchu vložen permanentní magnet, zatímco u druhého identického experimentu byl magnet odstraněn.

Na Obr. 6.7 je prostřednictvím SEM snímků zobrazený skleněný povrch s rhodaminem B podrobený DESI experimentu se SK obsahující feritové nanočástice

ve formě koloidního roztoku. Bylo pozorováno, že nanočástice v případě experimentu s vloženým permanentním magnetem (Obr. 6.7A) zůstávají na vzorkovacím povrchu i v místě centrální oblasti formace. V případě obdobného experimentu koncipovaného bez přítomnosti permanentního magnetu (Obr. 6.7B) se nanočástice formovaly do identických prvků povrchové formace, tak jak to bylo pozorováno u DESI experimentů bez nanočástic ve SK. Na základě výše popsanych experimentů s čistou SK a se SK s přídavkem nanočástic byla vyvrácená hypotéza, že by byl vznik povrchových formací ve formě potoků podmíněný hmotností částic, z kterých je formace tvořena. A to z toho důvodu, že agregované nanočástice situované na vzorkovacím povrchu jsou daleko větší než částice analytu zformované v rámci DESI experimentu bez přídavku nanočástic. Větší velikost (velikost agregátů se na základě odhadu ze SEM snímků pohybuje kolem desetin mikrometru) agregovaných nanočástic proto nemá vliv na kvalitu ani kvantitu povrchových formací.

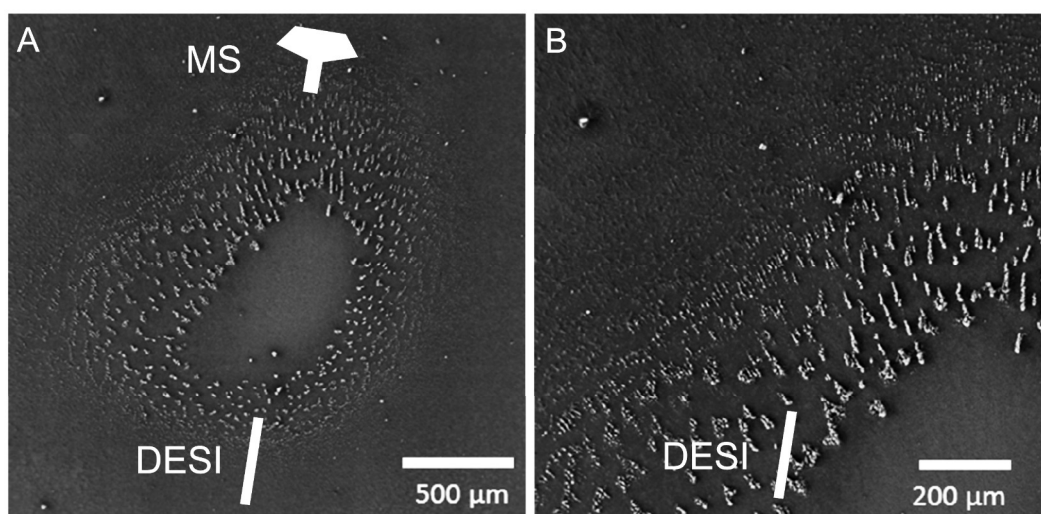


Obr. 6.7 SEM snímky zobrazující povrchové formace vznikající při dopadu kapiček DESI sprejeru obsahující Fe_3O_4 nanočástice na porézní PTFE povrchy s naneseným analytem rhodaminem B. (A) DESI experiment s vloženým permanentním magnetem. (B) DESI experiment bez přítomnosti permanentního magnetu.

Za účelem zhodnocení vlivu externího elektrostatického pole na formování povrchových struktur byly provedeny identické experimenty, vzhledem k výše uvedeným, s DESI ionizačním zdrojem, ovšem bez vloženého vysokého napětí na sprejeru. Takové experimentální uspořádání je známé jako technika jednoduché

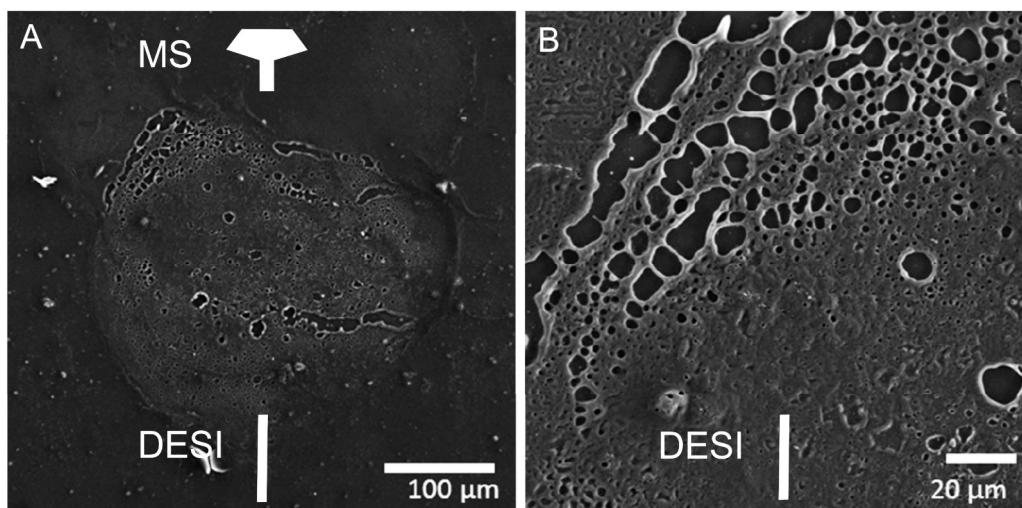
ambientní sprejové ionizace (EASI) [165,166] nebo také jako desorpčně extrakční elektrosprejová ionizace (DeSI) [12]. Shodně navržené experimenty byly provedeny i v případě nano-DESI instrumentace [158,159,167], která standardně pracuje bez přítomnosti dusíku jako nebulizačního plynu.

Na Obr. 6.8 jsou zobrazeny formace vzniklé na základě experimentu provedeného v režimu EASI. Dané formace jsou shodných tvarů a zakřivení jako v případě formací vzniklých za přítomnosti vysokého napětí. Z toho lze vyvodit, že absence externího elektrického pole nemá vliv na charakter povrchových formací.



Obr. 6.8 SEM snímky zobrazující povrchové formace vznikající při dopadu kapiček EASI spreje obsahujícího Fe_3O_4 nanočástice na skleněný povrch s naneseným analytem rhodaminem B. (A) Pohled na celý tvar a charakter formace vzniklé při EASI experimentu. (B) Detail povrchové formace vzniklé při EASI experimentu.

Na druhou stranu v případě nano-DESI experimentů nebyla potvrzena přítomnost těchto specifických povrchových formací, jak je patrné ze SEM snímků viz Obr. 6.9, a to i přes to, že je ze snímků zřejmé, že došlo k odplavení analytu z centrální dopadové oblasti kapiček spreje.



Obr. 6.9 SEM snímky zobrazující povrchové formace vznikající při dopadu kapiček nano-DESI spreje na skleněný povrch s naneseným analytem rhodaminem B. (A) Pohled na celý tvar a charakter formace vzniklé při nano-DESI experimentu. (B) Detail povrchové formace vzniklé při nano-DESI experimentu.

Provedené experimenty indikují, že existence povrchových formací s prvky tvarově podobnými potokům není ovlivňována externím elektrostatickým polem, ale přítomností dusíku jako nosného plynu. Podstatou zakřivení prvků povrchové formace, které bylo na řadě SEM snímků pozorováno, je potom nejspíše existence pohybu kapiček DESI spreje nejen v axiálním směru tj. v hlavním proudu spreje, ale také ve směru radiálním, v kterém ovšem kapičky disponují odlišnou hybností. Z důvodu nehomogenit v rámci hybnosti jednotlivých kapiček v radiálním směru dochází ke kompetitivním vztahům mezi touto složkou pohybu a rychlostí pohybu hlavního proudu kapiček spreje (ve směru proudu dusíku), právě díky čemuž zřejmě dochází k zakřivení drah kapiček spreje jako výsledného vektoru těchto sil.

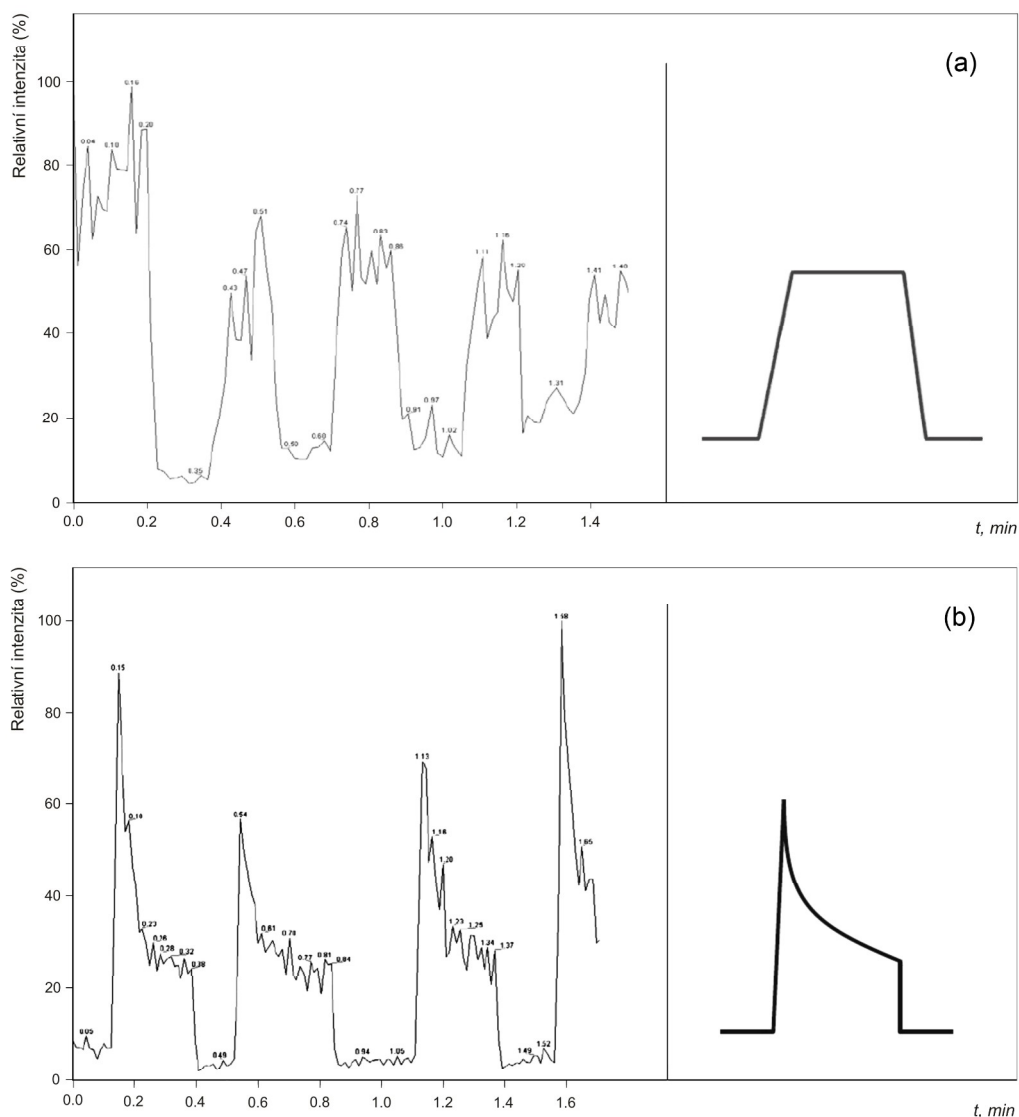
V publikace Gao *et al.* [168] byly popsány elektrostatické potenciálové dráhy vznikající na vzorkovacím povrchu z důvodu jeho nabíjení. Na základě našich pozorování však nebylo zaznamenáno, že by povrchové formace a jejich charakter nebo orientace byla těmito potenciálovými dráhami ovlivňována, a to jak v případě experimentálního uspořádání s vloženým vysokým napětím, tak i bez něj. Formace shodného tvaru byly kromě toho pozorovány i v případě agregace nanočástic v přítomnosti externího elektrického pole.

V případě nano-DESI experimentů, při kterých se obecně nepoužívá nosný plyn dusík, se ukázalo, že proud vzniklých kapiček spreje na základě elektrosprejování SK

je dostatečně silný k tomu, aby byly nanočástice obsažené v SK dopraveny na vzorkovací povrch. Ovšem jak se ukázalo, tak síla takto vzniklého spreje již není dostačující k tomu, aby došlo ke kompletnímu odplavení analytu z centrální oblasti dopadu kapiček spreje a k vytvoření formací podobných potokům (Obr. 6.9). Stejně tak je ze SEM snímků patrné, že nano-DESI sprej efektivně analyzuje daleko menší oblast plochy naneseného analytu oproti standardnímu DESI. Vzhledem k tomu, že obě experimentální uspořádání tj. nano-DESI i DESI poskytovaly shodná hmotnostní spektra, lze konstatovat, že vznikající povrchové formace mají pouze zanedbatelný nebo dokonce zcela žádný vliv na desorpčně ionizační procesy, a že je tak možné k objasnění DESI procesů v obou případech aplikovat všeobecně uznávaný „Droplet pick up“ mechanismus. Menší množství odplaveného analytu ze vzorkovacího povrchu v případě nano-DESI experimentů pravděpodobně souvisí a je svým způsobem kompenzované vyšší účinností ionizace nanospreje.

Další navržený experiment sloužící k objasnění fundamentálních procesů při DESI experimentech spočíval v periodickém blokování vzniku povrchových formací a tím i vzniku sekundárních kapiček DESI spreje. Cílem experimentu bylo zjistit, zda přítomnost fyzické bariéry nějakým způsobem ovlivňuje povrchové nabíjení, jak bylo popsáno v publikaci Volný *et al.* [51]. Mikroskopické sklo bylo během těchto experimentů periodicky vkládané mezi oblast dopadu spreje a kapiláru atmosférického vstupu MS. Jak bylo očekáváno, tak se daný zásah v podobě vkládání bariéry projevil v periodickém poklesu a nárůstu intenzity MS signálu. Pulsy v měřeném celkovém iontovém proudu měly obdelníkové tvary (Obr. 6.10a), bez toho, že by byly pozorovány nějaké významné kapacitní efekty resp. kumulace náboje. Daný výsledek je v kontrastu s výsledkem experimentu, při kterém byla periodická oscilace analytického signálu dosažena vypínáním a zapínáním vloženého vysokého napětí [51], kde jsou kapacitní efekty jasně zřetelné (Obr. 6.10b). Samotné fyzické blokování povrchových formací bez periodického zapínání a vypínání vysokého napětí na sprejeru tedy nevytvořilo žádné kapacitní efekty a jediným výsledkem bylo blokování analytu před vstupem do MS. To indikuje, že nabíjení povrchu je nezávislé na odplavování kapiček z oblasti dopadu spreje prostřednictvím povrchových formací a že je tak povrchové nabíjení ovlivňované pouze dopadem primárních kapiček spreje.

V případě techniky EASI pracující bez vkládaného vysokého napětí na sprejer nebyly zaznamenány žádné kapacitní efekty.



Obr. 6.10 Časový záznam a charakteristický tvar oscilace celkového iontového proudu (TIC) získaného během DESI-MS experimentu. (a) DESI-MS experiment s periodickým přerušováním procesu vzniku povrchových formací pomocí fyzické bariéry. (b) DESI-MS experiment s periodickým vypínáním a zapínáním vysokého napětí vkládaného na DESI sprejer.

Výsledky z provedených experimentů ukazují, že přestože jsou DESI, EASI a nano-DESI experimenty doprovázeny celou řadou povrchových jevů, které se mezi jednotlivými technikami mohou vzájemně lišit, tak tyto fenomény a odlišnosti nemají

signifikantní dopad na hlavní analytické využití těchto technik. To zároveň potvrzuje, že „Droplet pick up“ mechanismus je velmi robustní a funguje nezávisle na paralelně probíhajících povrchových procesech, ke kterým v průběhu DESI experimentů dochází.

6.3 Analýza melaminu v mléčných výrobcích prostřednictvím DAPPI-MS

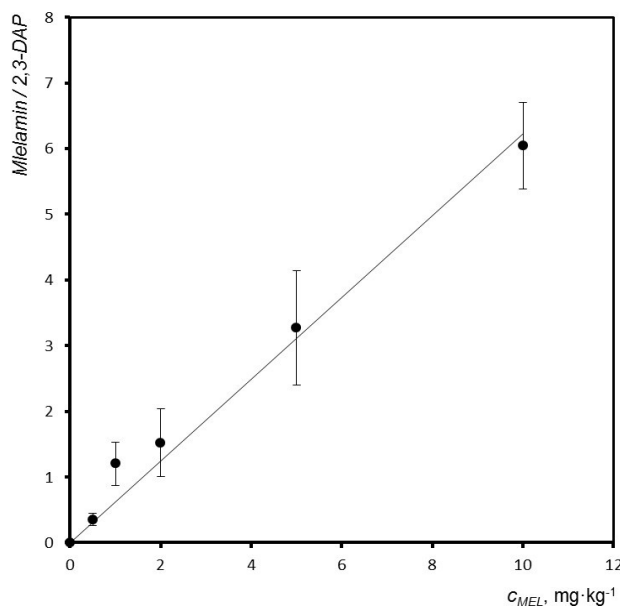
Na základě DAPPI-MS experimentálního uspořádání využívající univerzální platformu pro AIT byla vypracována metoda analýzy melaminu ve vzorcích mlék a smetany. Jako vzorkovací povrch byl využit PTFE 2, který se na základě série provedených testů ukázal nejvhodnějším.

Důležitými parametry analýz jsou obecně rychlost samotného analytického procesu a náročnost přípravy vzorku. Z toho důvodu byl v případě DAPPI analýzy melaminu minimalizován krok přípravy vzorku, který spočíval pouze v přidavku definovaného množství interního standardu a melaminu do mléka a v následném pipetování 1 μ l takto připraveného mléka či smetany (tvořícího jeden vzorek) na PTFE 2 povrch viz Obr. 6.11. S cílem dalšího zkrácení celého procesu přípravy vzorků, vzhledem k nutnosti jejich sušení, byl zaveden krok spočívající v zahřívání PTFE 2 povrchu s čerstvě nanesenými vzorky mlék na elektrické plotně při teplotě do 50 °C. Tento krok přípravy vzorku se ukázal jako výhodný, vzhledem k tomu, že se doba nutná k sušení zkrátila na méně než 2 minuty, a stejně tak proto, že na základě naměřených dat nebyl pozorován žádný negativní vliv související se zahříváním vzorků.



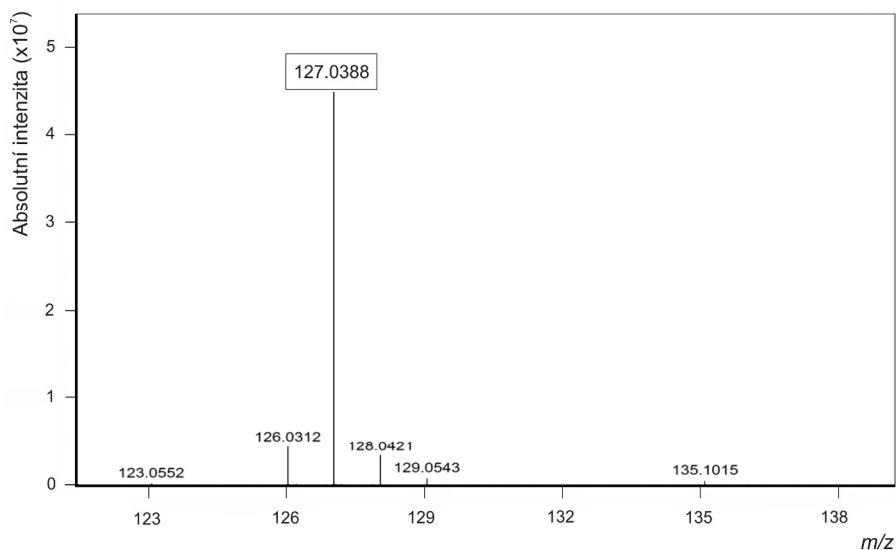
Obr. 6.11 PTFE 2 vzorkovací povrch s vysušenými vzorky mlék pro DAPPI-MS analýzu. Pětice tmavě zbarvených spotů představuje již analyzované vzorky v rámci série dvanácti vzorků na desce.

V rámci DAPPI-MS analýzy melaminu v mléce byly první experimenty zaměřeny na ověření vhodnosti vybraného vnitřního standardu 2,3-DAP pro daný typ analýz. Byla proto zkonstruována kalibrační křivka (s využitím vzorku polotučného mléka) pro poměry signálů analytu a interního standardu vs. koncentrace analytu. Na Obr. 6.12 je znázorněna kalibrační závislost získaná při experimentech provedených s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (LTQ Orbitrap XL), která vykazovala linearitu v celém rozsahu sledovaných koncentrací.

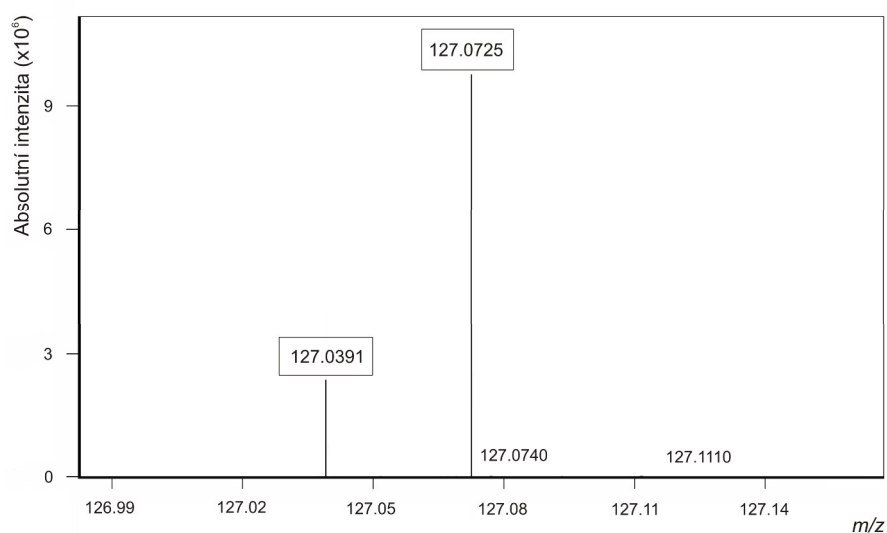


Obr. 6.12 Kalibrační křivka melaminu získaná pomocí DAPPI-Orbitrap MS analýzy. Kalibrace byla zhotovena na základě poměru analyt – interní standard (poměr absolutních intenzit signálů aduktů $[M+H]^+$) vzhledem ke koncentraci melaminu ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ve vzorku polotučného mléka. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám ($n=6$).

V případě analýzy vzorků mléka bylo potřeba odlišit signál melaminu od interferujícího 5-hydroxymethylfurfuralu (5-HMF), který vzniká teplotní degradací cukrů přítomných v mléku [129,169]. Jak je možné porovnat na základě spekter z Obr. 6.13, kde je zobrazeno spektrum sušeného mléka, a z Obr. 6.14, který znázorňuje spektrum mléka s přidavkem melaminu, tak se signály melaminu a 5-HMF lišily o cca 30 mmu. V případě analýz provedených na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením byly oba píky reprezentující tyto dvě různé sloučeniny zcela jasně rozlišené.



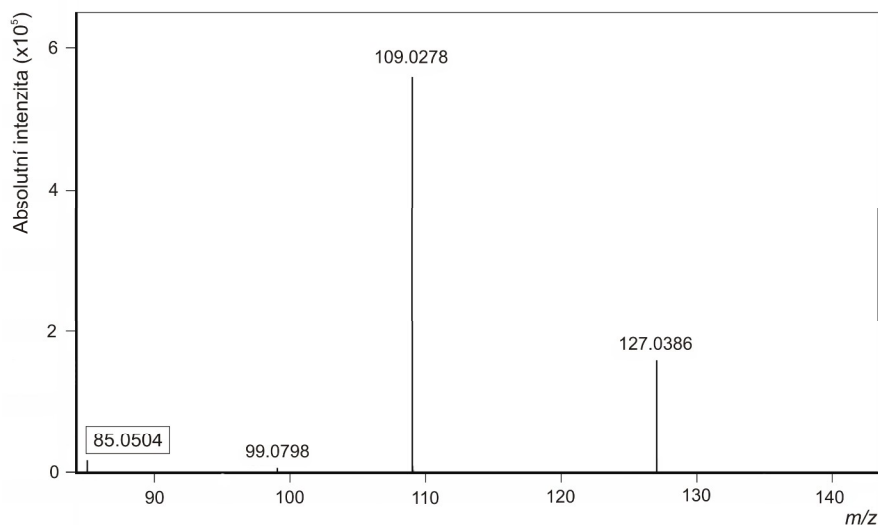
Obr. 6.13 DAPPI-Orbitrap MS spektrum analyzovaného vzorku mléka bez přídavku melaminu naneseného na PTFE 2 povrchu. Přítomnost 5-HMF odpovídá m/z 127,0388 ($[M+H]^+$).



Obr. 6.14 DAPPI-Orbitrap MS spektrum analyzovaného vzorku mléka s přídavkem melaminu naneseného na PTFE 2 povrchu. 5-HMF odpovídá m/z 127,0391 ($[M+H]^+$), zatímco signál melaminu je na m/z 127,0725 ($[M+H]^+$).

Identita melaminu byla dále potvrzena pomocí MS/MS fragmentačních spekter prekurzoru m/z 127. Z důvodu selekce iontů v lineární IT, kterou bylo možné provést pouze na úrovni nízkého rozlišení, došlo k fragmentaci obou iontů, a to melaminu i 5-HMF, díky čemuž byly ionty analyzované pomocí analyzátoru Orbitrap původem z obou těchto sloučenin. Obr. 6.15 zobrazuje diagnostický fragment melaminu na

m/z 85,0504 [169], který odpovídá ztrátě kyanamidové molekuly (NH_2CN), a u které je vyloučeno, že by pocházela z interferujícího 5-HMF iontu.



Obr. 6.15 DAPPI-Orbitrap MS/MS spektrum prekurzoru m/z 127 z analyzovaného vzorku mléka s přídavkem melaminu naneseného na PTFE 2 povrchu.

Vyhodnocení experimentálně získaných dat z DAPPI-MS analýz vzorků plnotučného mléka s obsahem tuku 3,5 % a smetany s 8 % resp. 16 % tuku, ke kterým bylo přidáváno definované množství melaminu v koncentracích 0,1 mg/kg; 1 mg/kg a 2 mg/kg je uvedené v tabulkách Tab. 6.1-6.3. Na základě daných absolutních intenzit signálů MEL a 2,3-DAP a jejich poměrů byly vypočítány příslušné aritmetické průměry těchto poměrů ($n=6$) a odpovídající směrodatné odchylky pro každou sadu vzorků mléčných produktů a koncentraci MEL viz Tab. 6.4.

Tab. 6.1 Hodnoty absolutních intenzit signálů a jejich poměrů pro MEL a interní standard 2,3-DAP ve třech sadách vzorků polotučného mléka (3,5 % tuku) lišících se koncentrací MEL (0,1 mg/kg; 1,0 mg/kg a 2,0 mg/kg), které byly podrobeny MS analýze v systému DAPPI-Orbitrap.

DAPPI-MS analýza plnotučného mléka (3,5 % tuku) s obsahem MEL								
Vzorky mléka s koncentrací MEL 0,1 mg/kg			Vzorky mléka s koncentrací MEL 1,0 mg/kg			Vzorky mléka s koncentrací MEL 2,0 mg/kg		
Číslo měření	Absolutní intenzity signálů MEL/2,3-DAP [$\times 10^3$]	Poměr absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	Číslo měření	Absolutní intenzity signálů MEL/2,3-DAP [$\times 10^3$]	Poměr absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	Číslo měření	Absolutní intenzity signálů MEL/2,3-DAP [$\times 10^3$]	Poměr absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP
1	9,4 / 304,2	0.0309	1	5,2 / 12,0	0.4317	1	21,6 / 18,0	1.2
2	9,7 / 46,4	0.2091	2	13,5 / 17,3	0.7802	2	20,5 / 16,2	1.2676
3	16,7 / 70,9	0.2355	3	33,9 / 22,9	1.4763	3	30,2 / 13,8	2.1908
4	12,9 / 26,4	0.4894	4	13,5 / 20,7	0.6522	4	45,6 / 19,0	2.3945
5	10,2 / 37,8	0.2696	5	9,7 / 6,4	1.5232	5	16,4 / 13,2	1.2419
6	45,4 / 177,6	0.2556	6	33,9 / 101,0	0.3356	6	13,8 / 6,85	2.0146

Tab. 6.2 Hodnoty absolutních intenzit signálů a jejich poměrů pro MEL a interní standard 2,3-DAP ve třech sadách vzorků smetany (8 % tuku) lišících se koncentrací MEL (0,1 mg/kg; 1,0 mg/kg a 2,0 mg/kg), které byly podrobeny MS analýze v systému DAPPI-Orbitrap.

DAPPI-MS analýza smetany (8 % tuku) s obsahem MEL								
Vzorky mléka s koncentrací MEL 0,1 mg/kg			Vzorky mléka s koncentrací MEL 1,0 mg/kg			Vzorky mléka s koncentrací MEL 2,0 mg/kg		
Číslo měření	Absolutní intenzity signálů MEL/2,3-DAP [$\times 10^3$]	Poměr absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	Číslo měření	Absolutní intenzity signálů MEL/2,3-DAP [$\times 10^3$]	Poměr absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	Číslo měření	Absolutní intenzity signálů MEL/2,3-DAP [$\times 10^3$]	Poměr absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP
1	0,7 / 529	0.0013	1	19,8 / 937	0.0211	1	62,7 / 1300	0.0482
2	5,2 / 916	0.0077	2	124 / 1700	0.0729	2	32,4 / 739	0.0438
3	0,8 / 660	0.0013	3	119 / 2140	0.0556	3	25 / 257	0.0973
4	0,3 / 481	0.0006	4	4,8 / 255	0.0187	4	286 / 2980	0.096
5	1,7 / 274	0.0062	5	10 / 331	0.0302	5	316 / 2410	0.1311
6	19,5 / 3460	0.0056	6	18,2 / 1140	0.016	6	137 / 2500	0.0548

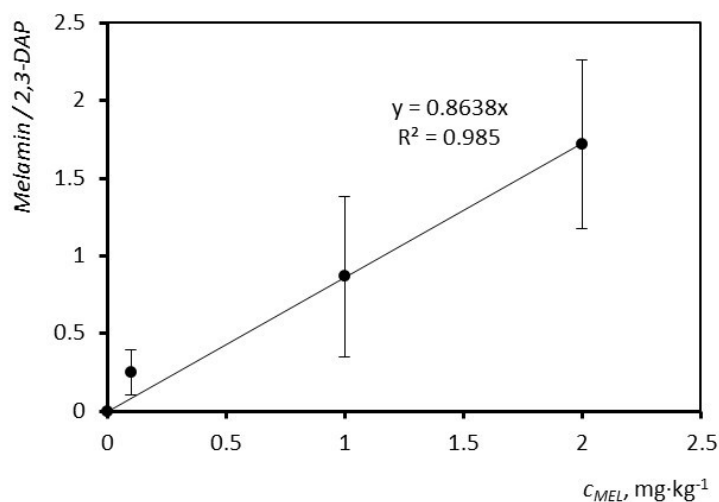
Tab. 6.3 Hodnoty absolutních intenzit signálů a jejich poměrů pro MEL a interní standard 2,3-DAP ve třech sadách vzorků smetany (16 % tuku) lišících se koncentrací MEL (0,1 mg/kg; 1,0 mg/kg a 2,0 mg/kg), které byly podrobeny MS analýze v systému DAPPI-Orbitrap.

DAPPI-MS analýza smetany (16 % tuku) s obsahem MEL								
Vzorky mléka s koncentrací MEL 0,1 mg/kg			Vzorky mléka s koncentrací MEL 1,0 mg/kg			Vzorky mléka s koncentrací MEL 2,0 mg/kg		
Číslo měření	Absolutní intenzity signálů MEL/2,3-DAP [$\times 10^3$]	Poměr absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	Číslo měření	Absolutní intenzity signálů MEL/2,3-DAP [$\times 10^3$]	Poměr absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	Číslo měření	Absolutní intenzity signálů MEL/2,3-DAP [$\times 10^3$]	Poměr absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP
1	0,8 / 3580	0.0002	1	18,5 / 295	0.0627	1	16,8 / 278	0.0604
2	1,7 / 778	0.0021	2	6,7 / 218	0.0307	2	12,6 / 246	0.0512
3	3,2 / 759	0.0043	3	8,6 / 290	0.0297	3	5,5 / 131	0.0424
4	1,8 / 703	0.0026	4	4,6 / 146	0.0313	4	2,9 / 49,5	0.0598
5	5 / 748	0.0067	5	3,9 / 118	0.033	5	1,6 / 15,7	0.1025
6	4,3 / 645	0.0067	6	5,8 / 175	0.0334	6	3,6 / 60,4	0.0598

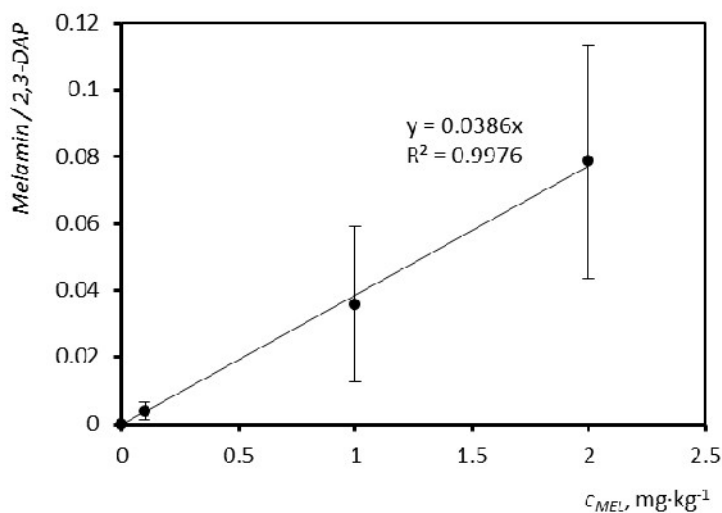
Tab. 6.4 Hodnoty aritmetických průměrů poměrů absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP a příslušných směrodatných odchylek pro tři sady vzorků (polotučné mléko s 3,5 % tuku; smetana s 8 % tuku; smetana s 16 % tuku) s obsahem MEL (0,1 mg/kg; 1,0 mg/kg a 2,0 mg/kg) analyzovaných v systému DAPPI-MS.

DAPPI-MS analýza plnotučného mléka (3,5 % tuku) s obsahem MEL			DAPPI-MS analýza smetany (8 % tuku) s obsahem MEL			DAPPI-MS analýza smetany (16 % tuku) s obsahem MEL		
C_{MEL} [mg/kg]	Aritmetický průměr poměrů (n=6) absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	Směrodatná odchylka hodnot poměrů (n=6) absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	C_{MEL} [mg/kg]	Aritmetický průměr poměrů (n=6) absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	Směrodatná odchylka hodnot poměrů (n=6) absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	C_{MEL} [mg/kg]	Aritmetický průměr poměrů (n=6) absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP	Směrodatná odchylka hodnot poměrů (n=6) absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0.2484	0.1476	0,1	0.0038	0.0026	0,1	0.0038	0.0026
1	0.8665	0.5152	1	0.0358	0.0232	1	0.0368	0.0128
2	1.7182	0.5417	2	0.0785	0.0349	2	0.0627	0.0207

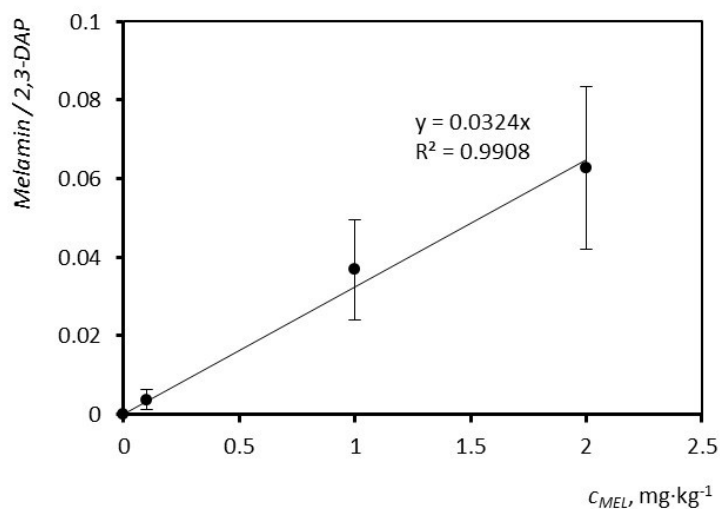
Z vypočítaných hodnot aritmetických průměru poměrů absolutních intenzit signálů MEL/2,3-DAP a směrodatných odchylek byly sestrojeny kalibrační závislosti poměru analyt-interní standard pro každý typ testovaného mléčného produktu a příslušných koncentrací MEL ve vzorku (Obr. 6.16-6.18).



Obr. 6.16 Na základě DAPPI-Orbitrap MS analýzy získaná závislost poměru analyt – interní standard (poměr absolutních intenzit signálů aduktů $[M+H]^+$) vzhledem ke koncentraci melaminu (0,1 mg·kg⁻¹, 1 mg·kg⁻¹ a 2 mg·kg⁻¹) ve vzorcích plnotučného mléka s 3,5 % tuku. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám (n=6).



Obr. 6.17 Na základě DAPPI-Orbitrap MS analýzy získaná závislost poměru analyt – interní standard (poměr absolutních intenzit signálů aduktů $[M+H]^+$) vzhledem ke koncentraci melaminu (0,1 mg·kg⁻¹, 1 mg·kg⁻¹ a 2 mg·kg⁻¹) ve vzorcích smetany s 8 % tuku. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám (n=6).



Obr. 6.18 Na základě DAPPI-Orbitrap MS analýzy získaná závislost poměru analyt – interní standard (poměr absolutních intenzit signálů aduktů $[M+H]^+$) vzhledem ke koncentraci melaminu (0,1 mg·kg⁻¹, 1 mg·kg⁻¹ a 2 mg·kg⁻¹) ve vzorcích smetany s 16 % tuku. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám (n=6).

Směrnice závislostí poměrů absolutních intenzit signálů (aduktů $[M+H]^+$) analytu a interního standardu z naměřených DAPPI-MS dat pro vzorky mlék a smetany (viz Obr. 6.16 – 6.18) vykazovaly výraznou odlišnost. Při porovnání dosahovaly směrnice závislostí pro vzorky smetan s 8 % a 16 % tuku podstatně nižších hodnot vzhledem ke směrnici plnotučného mléka s obsahem tuku na úrovni 3,5 %. Z naměřených hodnot absolutních intenzit signálů bylo patrné (viz Tab. 6.1-6.3.), že v případě analyzovaných vzorků smetan docházelo v systému DAPPI-Orbitrap k výraznému nárůstu signálu interního standardu vlivem matričních efektů. Ukázalo se tak, že se 2,3-DAP jako interní standard chová v případě DAPPI-MS analýzy různých druhů mléčných produktů, tj. v prostředí vlivu různých matričních efektů, odlišně od MEL. Vypracovaná metoda DAPPI-MS analýzy MEL ve vzorcích mléčných produktů tak ve stávající podobě dostatečně neřeší matriční efekty a i když metoda vykazuje poměrně dobrou citlivost, tak ji bohužel nelze využít pro rutinní analýzu vzhledem ke skutečnosti, že by byla kvantifikace zatížena významnou chybou v závislosti na analyzovaném druhu mléčného produktu. Metoda je tak z tohoto pohledu limitována nicméně i přesto ji lze využít pro analýzu MEL v mléčných produktech, ovšem s nutností zkonstruování kalibrační závislosti pro každý typ mléčného produktu zvlášť, což by bylo v praxi reálných vzorků poměrně náročné.

6.4 MALDI-MSI biologických vzorků hmyzu

Technika MALDI v režimu MSI byla v této práci využita k analýze vzorků dospělců čmeláka zemního a octomilky obecné v rámci dvou samostatných projektů.

LDI/MALDI-MSI experimenty s octomilkami obecnými byly zaměřeny na studium kutikulárních lipidů, a to zejména samičích a samčích sexuálních feromonů s cílem zjištění jejich distribucí na povrchu much. Studovány byly panenské i spárené vzorky much za účelem porovnání lipidů přítomných na kutikule, na základě čehož byl demonstrován přenos biologicky aktivních látek ze samce na samici, ke kterému dochází během kopulace.

Cílem experimentů se vzorky čmeláka zemního bylo ověření vhodnosti nového fixačního média na bázi pHPMA pro MALDI-MSI experimenty, a to jednak z pohledu zpracovatelnosti polymeru a obecné vhodnosti pro daný typ experimentů, tak i jeho případného vlivu na potlačování ionizace sledovaných analytů ve vzorku. Při řešení projektu byl zároveň vypracován nový způsob přípravy vzorků hmyzu pro kryomikrotomické řezání.

6.4.1 MALDI-MSI much octomilek obecných

O povaze provedených MALDI-MSI experimentů se vzorky much octomilek obecných můžeme hovořit jako o 2-D MSI 3-D biologických objektů. Je nutné zdůraznit, že experimenty tohoto typu jsou v obecné rovině ve srovnání s klasickými 2-D MSI analýzami planárních vzorků (např. kryomikrotomických řezů) daleko náročnější. Na základě této skutečnosti vyplynulo několik bodů, které bylo v rámci tohoto projektu nutno brát v úvahu.

První bod vyplýval ze skutečnosti, že laser MALDI přístroje je během analýzy fixně fokusovaný na jednu výškovou hladinu. Díky tomu docházelo v případě povrchové analýzy oblastí 3-D biologického objektu, které se vyskytovaly nad nebo pod touto hladinou, k absorpci rozdílných kvant energie molekulami přítomnými na povrchu, a to kvůli defokusaci laserového paprsku. V souvislosti s tím jako důsledek 3-D profilu biologického objektu musely ionty vzniklé na různých výškových hladinách urazit různě dlouhou dráhu letu (TOF analyzátor) a to zároveň v kombinaci s

odlišnou počáteční trajektorii v závislosti na zakřivení profilu vzorku. Tyto skutečnosti mají obecně za následek posun hodnot m/z .

Druhým bodem, který není ryze specifický pouze pro 2-D MSI 3-D biologických objektů, ale vyskytuje se i u klasického zobrazování 2-D kryomikrotomických řezů, byla kumulace náboje na povrchu vzorku. K tomuto jevu dochází díky nevodivé tkáni vzorku, která se v blízké oblasti opakovaného dopadu laserového paprsku může nabíjet, což negativně ovlivňuje samotný vznik a extrakci na povrchu vznikajících iontů a v důsledku vede opět k posunu hodnot m/z .

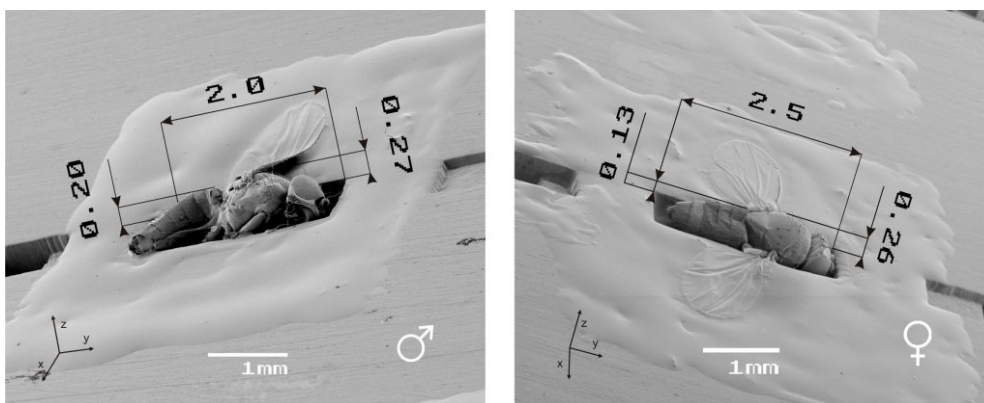
Třetí bod vyplýval z povahy 3-D intaktního biologického vzorku a souvisel s rozdílnou morfologií různých částí povrchu objektu, které potenciálně mohli negativně ovlivňovat kvalitu vrstvy nanášené matrice.

6.4.1.1 Přínos MALDI desek pro MSI analýzu octomilek obecných

Celkem byly navrženy dva různé typy speciálních MALDI desek designovaných pro experimenty se vzorky much octomilek obecných. První typ MALDI desek, který obsahoval pouze jednoduchou drážku napříč destičkou, byl brzy nahrazen vhodnějším typem MALDI desky s komplexně profilovanými samčími a samičími jamkami.

Hlavní přínos individuálních samčích a samičích jamek spočíval v zajištění konzistentního přesahu těl much octomilek, v řádech několika stovek mikrometrů vůči kovové desce viz Obr. 6.19. Kromě toho bylo možné díky daným jamkám dodržet optimální profil much tj. jemné výškové odstupňování hlavy a hrudi vzhledem k zadečku a křídům mouchy. V opačném případě by měly výrazné výškové změny negativní dopad na výsledek experimentu. Jamky tak díky komplexní fixaci zajišťovaly ideální prostorovou orientaci much na vzorkovací destičce. To bylo v důsledku žádoucí především z toho důvodu, že paprsek laseru v rámci MALDI instrumentace, jak již bylo výše zmíněno, je během experimentu fokusovaný pouze na jednu určitou výškovou hladinu, tj. není jej možné během analýzy přeastřovat.

Profilované jamky kromě výše uvedeného měly výhodu i v částečné korekci deformací vznikajících z důvodu sesychání vzorků.



Obr. 6.19 SEM snímky much octomilek obecných pořízených pod úhlem 65° demonstrující přesah těl much nad rovinou MALDI desky. Uvedené hodnoty jsou v milimetrech.

Nicméně i přes všechny zmíněné výhody těchto MALDI desek bylo pozorováno, že z částí těl much lokalizovaných, vzhledem k rovině MALDI desky, na nejvyšší hladině, a to především z thoraxu, byly signály sledovaných analytů v nižších intenzitách nebo nebyly vůbec přítomny v porovnání se zbylými částmi těla. K podobnému jevu docházelo i v případě abdomenu resp. jeho posledních tergítů, které byly naopak výškově položeny nejnižší.

Na základě Obr. 6.19, kde byly pomocí SEM snímků pořízených pod úhlem 65° zobrazeny přesahy těl much samce fixovaného na desce z boku a samice zobrazené shora, bylo možné určit přibližnou hodnotu přesahů jednotlivých částí těl much nad rovinou MALDI desky. Při porovnání hodnot přesahů pro abdomen a thorax byly získány hodnoty 0,20 mm (abdomen) a 0,27 mm (thorax) pro samce fixovaného z boku a 0,13 mm (abdomen) a 0,26 mm (thorax) pro samici fixovanou v jamce spodní části abdomenu a thoraxu. Z toho, spolu s dalšími podobnými odhady z pořízených SEM snímků, vyplývá, že dané přesahy samčích i samičích much fixovaných na MALDI deskách z boku nebo shora byly velmi podobné.

6.4.1.2 Příčiny a důsledky posunu hmotností při MSI analýzách octomilek obecných

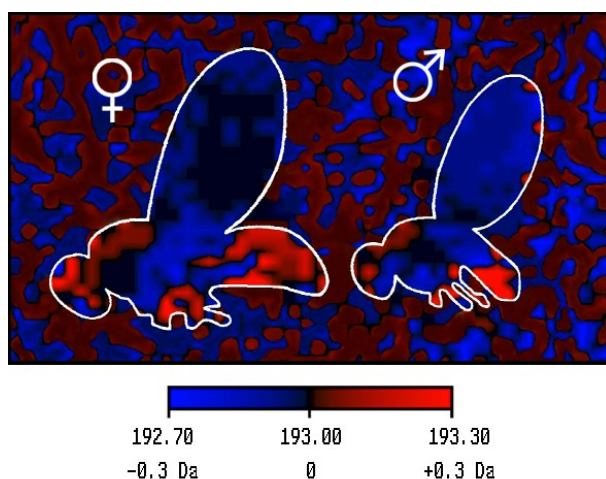
Posun hmotností je výsledkem kombinací řady faktorů. Jedním z nich je nabíjení povrchu vzorků s nízkou vodivostí, které vzniká kumulací laserem

indukovaných fotoelektronů. Pokud je záporný elektrický náboj kumulován na povrchu vzorku, který je fixovaný na kovové MALDI desce při pozitivním napětí (5 kV), potom je počáteční kinetická energie kladně nabitých iontů redukována v každé části vzorku, kde je náboj akumulován [170].

Dalším důležitým fyzikálním fenoménem, který ovlivňuje kvalitu měřených dat, je potenciálová jáma, která vzniká v případě, kdy MALDI deska obsahuje struktury, jako jsou jamky nebo drážky. Vlivem elektrického pole při okrajích jamek resp. drážek dochází k zadržování laserovou desorpce vzniklých iontů lokalizovaných pod úrovní okrajů výše zmíněných struktur. Na základě našich pozorování (experimenty provedené na přístroji MALDI Micro MX, Waters, UK) můžeme říci, že desorbované ionty z hloubky větší než 200 μm se nedostávají do TOF analyzátoru a tím tak unikají detekci.

Míra posunu měřených hodnot m/z , kromě již zmíněných jevů, dále záleží i na parametrech MALDI přístroje a jeho nastavení během MSI experimentu (zvolená frekvence laseru atp.) [171,172].

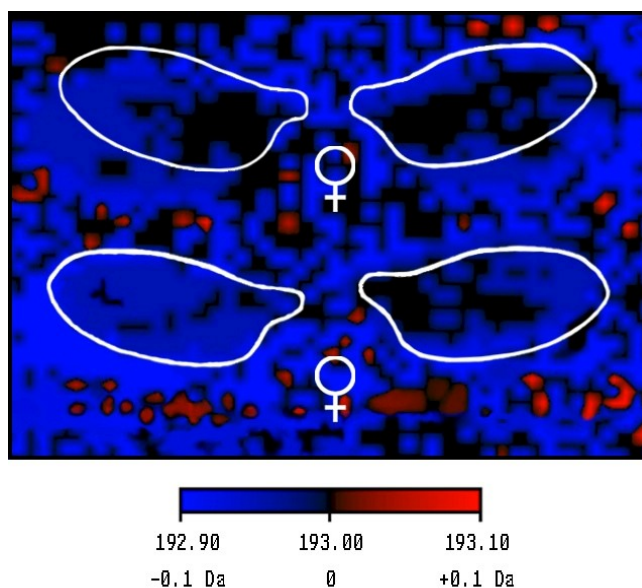
Níže uvedený Obr. 6.20 barevně znázorňuje posun hodnot m/z , který byl pozorovaný během MALDI-MSI experimentu páru much octomilek fixovaných v profilovaných jamkách a pokrytých matricí LiDHB.



Obr. 6.20 Vizualizace posunu hmotností (adukt m/z 193,0 ($[\text{DHB}+\text{K}]^+$) demonstrována na MALDI-MSI experimentu s párem much octomilek obecných fixovaných na MALDI desce pokrytých matricí LiDHB. Černě zbarvené oblasti odpovídají nulovému posunu hmotností. Světle červené resp. modré oblasti korespondují maximálnímu posunu v hodnotách $\pm 0,3$ Da.

Světle červené resp. modré oblasti na obrázku odpovídají maximálnímu posunu hmotností v hodnotě $\pm 0,3$ Da. Tmavě modré a černé oblasti potom odpovídají zejména křídům a hrudi much. Na základě Obr. 6.20 můžeme říci, že míra posunu hmotností roste na MALDI desce v následujícím pořadí: křídla, hrud' (která je částečně překrytá v případě zde uvedeného snímku křídly), zadeček a hlava. Výsledkem výše zmíněných efektů je posun hmotností (v případě UV-LDI/MALDI experimentů s octomilkami, který se pohybuje v desetinách hmotnostních jednotek. Zobrazené oblasti lokalizované mimo těla much (Obr. 6.20) mají zabarvení v podobě tmavě červených a tmavě modrých struktur podobných ostrůvkům. Tato zabarvení pravděpodobně odpovídají mírně vyvýšeným oblastem vzniklých z nanesené matrice a epoxidového lepidla, kterým byla celá zobrazovaná oblast před sprejováním matrice pokrytá.

Pro porovnání je na Obr. 6.21 znázorněn posun hmotností v rámci dvou párů samičích křídel fixovaných na MALDI desce v oblasti ležící mimo profilované jamky. Oba páry křídel byly pokryty LiDHB matricí a analyzovány v režimu MALDI MSI. Jak je z Obr. 6.21 patrné, tak posun hmotností se v případě křídel tj. planárního vzorku, pohybuje v maximech $\pm 0,1$ Da.

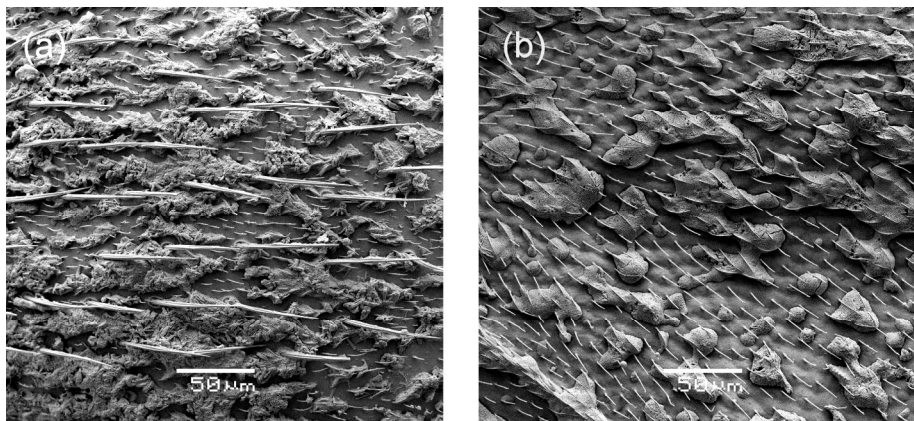


Obr. 6.21 Vizualizace posunu hmotností (adukt m/z 193,0 ($[DHB+K]^+$) demonstrována na MALDI MSI experimentu se dvěma páry samičích křídel octomilek fixovaných na MALDI desce a pokrytých matricí LiDHB. Černě zbarvené oblasti odpovídají nulovému posunu hmotností. Světle červené resp. modré oblasti korespondují maximálnímu posunu v hodnotách $\pm 0,1$ Da.

6.4.1.3 Nanášení matrice na intaktní jedince much octomilek obecných

Proces sprejování matrice na vzorky much pomocí komerční rozprašovací pistole byl optimalizovaný na řadě vzorků, dokud nebylo dosaženo nejvyšší kvality naměřených dat. Sprejování probíhalo v přerušovaných krocích, které od sebe byly odděleny v intervalech 4 vteřin sloužících k odpaření rozpouštědla a krystalizaci vrstvy nanesené matrice. Počet vrstev aplikovaných na jeden vzorek much se pohyboval kolem 90, a to z toho důvodu, aby byla vzniklá vrstva matrice co nejvíce homogenní. Finální vrstva matrice vzniklá z velkého počtu tenkých vrstev totiž zabraňuje vzniku velkých krystalů, které by mohly negativně ovlivnit výsledek samotného MSI experiment.

Na SEM snímcích (Obr. 6.22) je zobrazena morfologie kutikuly samčího dospělce octomilky obecné pokryté vrstvou matrice LiDHB, a to v podobě detailu hrudní kutikuly (Obr. 6.22a) a kutikuly z oblasti křídla (Obr. 6.22b). Na základě uvedených snímků lze konstatovat, že kutikula byla kompletně pokryta matricí ve formě krystalů uspořádaných do podoby klastrů o velikosti od 50 do 100 μm , které byly od sebe odděleny matricí nepokrytými oblastmi o velikostech přibližně 30 μm [37].



Obr. 6.22 SEM snímky detailu kutikuly samčího dospělce octomilky obecné pokryté vrstvou matrice LiDHB. (a) SEM snímek detailu kutikuly lokalizované na hrudi samce. (b) SEM snímek detailu kutikuly lokalizované na křídle samce.

Na základě SEM snímků nebyl pozorován relevantní rozdíl v kvalitě nanesené matrice v oblasti hrudi, křídel nebo zadečku u samčích i samičích dospělců much

octomilek obecných, a to i s ohledem na různou morfologii těchto povrchů v podobě jemných chloupků a trnů. Z toho důvodu tj. z důvodu homogenity vzniklé vrstvy matrice na vzorku, byl přístup nanášení matrice formou sprejování pomocí rozprašovací pistole považován za vhodný pro daný typ prováděných MSI experimentů.

6.4.1.4 MALDI-MSI kutikulárních lipidů octomilek obecných

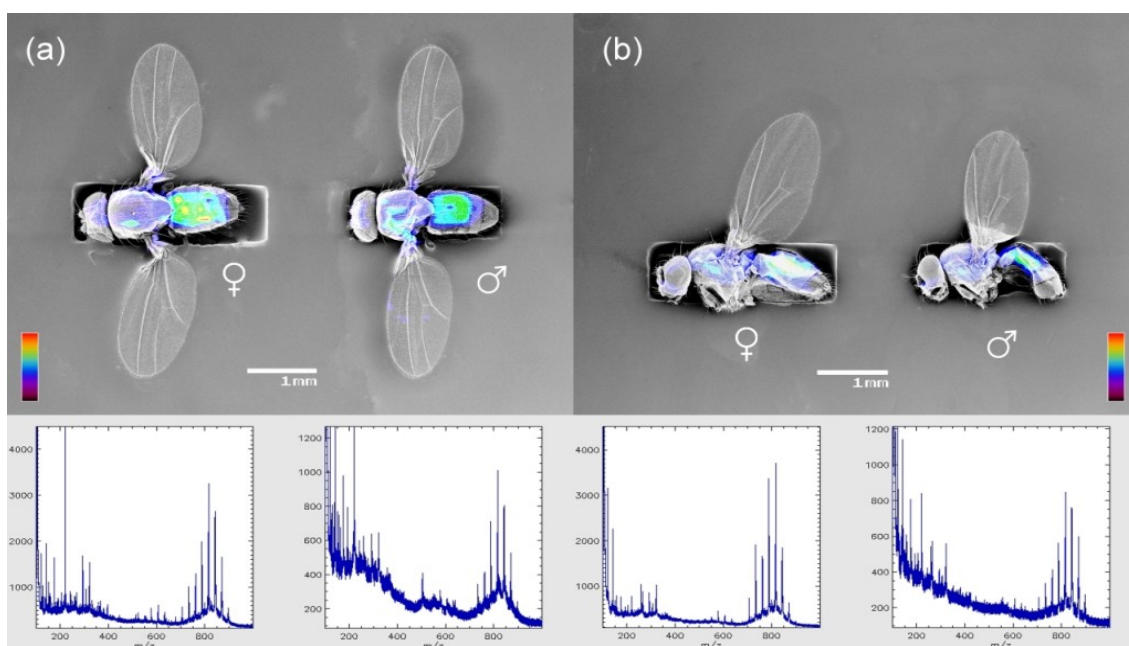
Kutikulární lipidy panenských i spářených samců a samic octomilek obecných byly v rámci projektu analyzovány přístupy LDI a MALDI MSI. Získaná data (MassLynx v 4.0 (Waters, UK)) z MSI experimentů v podobě hmotnostních spekter obsahujících signály sledovaných analytů byla zkonvertována pomocí programu MALDI Image Converter (Waters, UK) do formátu .MSI a zpracována pomocí BioMap softwaru (Novartis, Švýcarsko) do 2-D map distribuce analytů, které byly barevně kódovány (0-255) v souladu s jejich intenzitou.

Hmotnostní spektra získaná během LDI-MSI experimentů byla charakterizována na základě preference vzniku aduktů molekul analytů s draslíkem a sodíkem ($[M+K]^+$; $[M+Na]^+$). Draslík i sodík se na povrchu kutikuly vyskytují zcela přirozeně [37] a stejně tak i dostatečně homogenně na celém povrchu mouchy, jak bylo ukázáno na Obr. 6.20 resp. Obr. 6.21, kde byla zobrazena distribuce aduktu s hmotností m/z 193.0 ($[DHB+K]^+$). Přítomnost sodných a draselných iontů na povrchu kutikuly je tak v souladu s předchozími LDI experimenty [173], které ovšem byly provedeny za vyššího tlaku v MALDI zdroji oproti výsledkům prezentovaným v této práci.

Na základě MSI experimentů s octomilkami obecnými bylo dále zjištěno, že množství vody ve vzorku negativně ovlivňuje kvalitu naměřených hmotnostních spekter, a to jak v LDI, tak i v MALDI režimu. Přítomnost vody ve vzorcích negativně ovlivňuje účinnost ionizace, a to speciálně ionizaci kutikulárních uhlovodíků. Z toho důvodu postup přípravy vzorků much zahrnoval krok sušení v exsikátoru.

Dva páry 6 dní starých panenských much octomilek obecných byly zobrazovány v pozitivním LDI režimu (Obr. 6.23). Snímky z elektronové mikroskopie (SEM) získané po úspěšně provedených MSI experimentech byly převrstveny 2-D mapou intenzit iontů barevně kódovanou ve stupnici od 0 do 255. Na Obr. 6.23a, kde je zobrazen první pár much, je ukázán TIC na dorzální straně těl much. Obrázek druhého

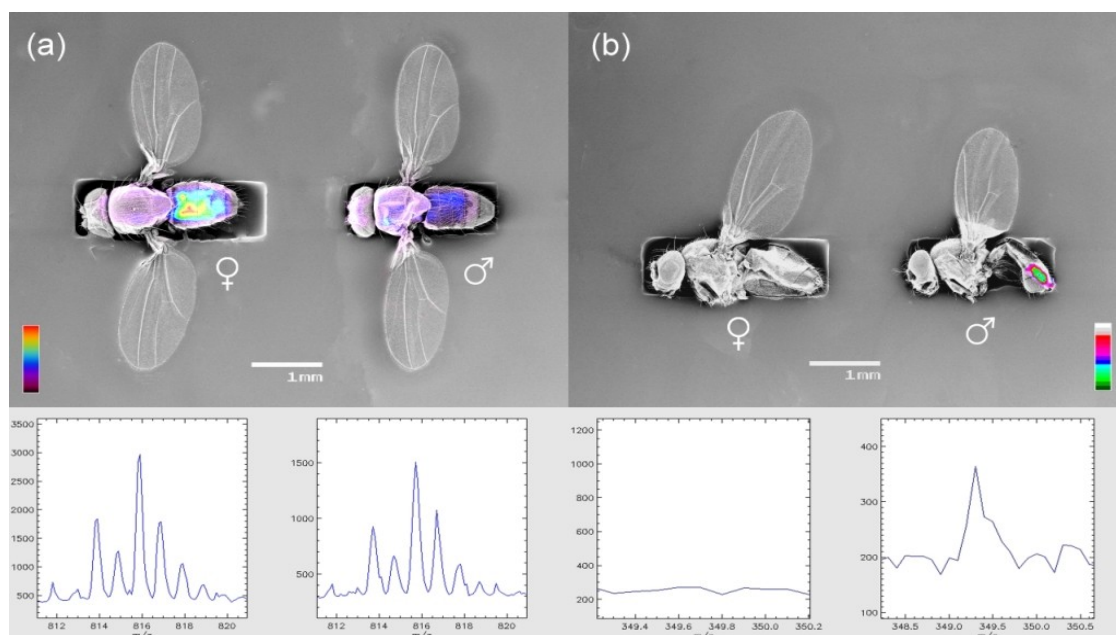
páru much (Obr. 6.23b) potom odpovídá distribuci TIC z laterální strany. Nejsilnější a nejbohatší signály byly naměřeny z abdominálních oblastí, a to jak u samců, tak u samic. Nicméně oblast samičího abdomenu vždy poskytovala nejsilnější TIC signál (hodnoty absolutních intenzit signálů byly pro oblast samičího abdomenu 4000 vs. 1200 pro samčí abdomen viz spektra pod Obr. 6.23). Nízký signál pocházející z posledních dvou viditelných abdominálních tergů (Obrázek 6.23a) pravděpodobně souvisí s poklesem intenzit signálů z analyzovaných oblastí těla mouchy, které se vyskytují pod úrovní roviny MALDI desky.



Obr. 6.23 SEM snímky dvou párů (6 dní starých) panenských much octomilek obecných překrytých 2-D mapou intenzit signálů sledovaných analytů (BioMap). Měřeno v LDI MSI pozitivním režimu. (a) Celkový iontový proud (TIC) m/z 100 – 1000. (b) TIC m/z 100 – 1000.

Distribuce TGs na tělech celých intaktních much je ukázána na Obr. 6.24a. Intenzivnější signály TGs byly přitom pozorovány na samičím abdomenu. Na Obr. 6.24b můžeme vidět slabý signál odpovídající draselnému aduktu 11-*cis*-vakcenylyl acetátu (cVA), který je lokalizován na posledních viditelných tergitech samčího zadečku. cVA je samčí anti-atraktant [174] a přirozeně se vyskytuje na samčím genitálu. Distribuce, kterou můžeme pozorovat na Obr. 6.24b, která není lokalizována výhradně na samčím genitálu je pravděpodobně způsobena difuzí cVA ve vrstvě

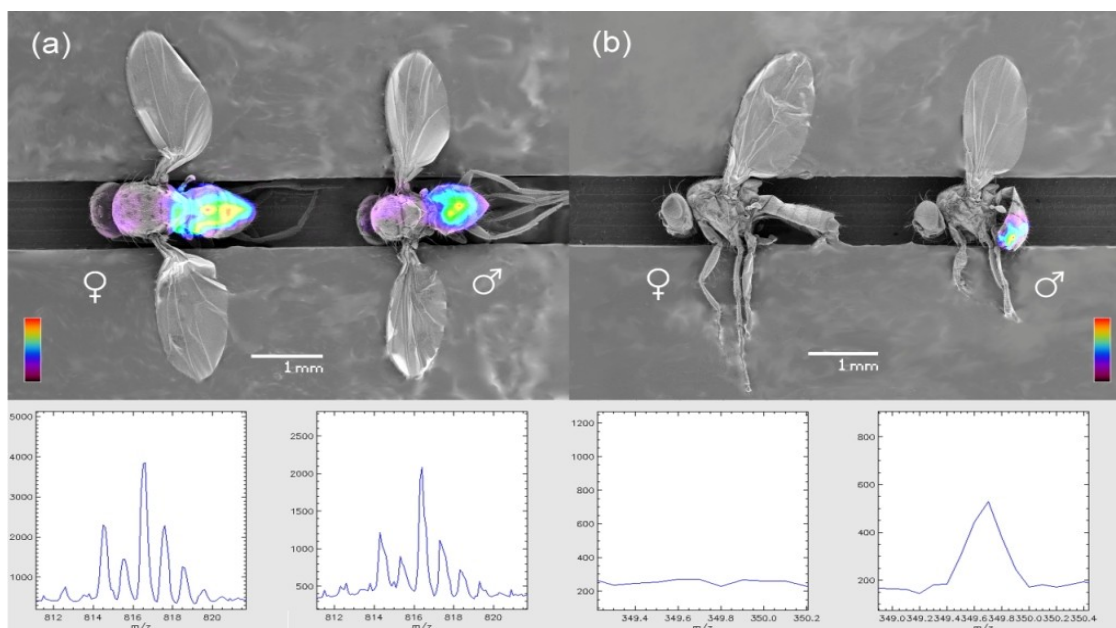
kutikulárních lipidů do oblasti posledních dvou viditelných abdominálních tergítů. Dalším vysvětlením získané distribuce je možnost záměrného přenos cVA z genitálu na abdomen samotným samcem, a to prostřednictvím svých nohou. Distribuce TGs a cVA byla potvrzena MALDI-MSI experimenty viz Obr. 6.25, který pro porovnání zobrazuje dospělé much fixovaných ve starším typu speciálních MALDI desek obsahujících pouze jednoduchou drážku.



Obr. 6.24 SEM snímky dvou párů (6 dní starých) panenských octomilek obecných překrytých 2-D mapou intenzit signálů sledovaných analytů (BioMap). Měřeno v LDI MSI pozitivním režimu. (a) TGs m/z 810 – 820. (b) cVA m/z 349,2 – 349,6 ($[M+K]^+$).

V případě experimentů s octomilkami obecnými provedených v režimu LDI-TOF nebyly pozorovány žádné signály odpovídající kutikulárním uhlovodíkům. Konkrétně byly sledovány signály samičích feromonů 7,11-HD a 7,11-ND z oblasti hrudi a báze křídel. Kutikulární uhlovodíky nicméně byly pozorovány při LDI experimentech s orthogonálním TOF analyzátozem probíhajících za vyššího tlaku ve zdroji [155,175]. Absence těchto uhlovodíků v případě experimentů provedených na přístroji MALDI Micro MX byla pravděpodobně způsobena právě odlišným tlakem ve zdroji, který byl mimo optimální hodnoty pro ionizaci daných uhlovodíků. Spolu s tím

měla na ionizaci vliv také velmi nízká absolutní koncentrace uhlovodíků na kutikule a stejně tak jejich obecně nízká ionizace-kationizace v bezmatricovém systému.



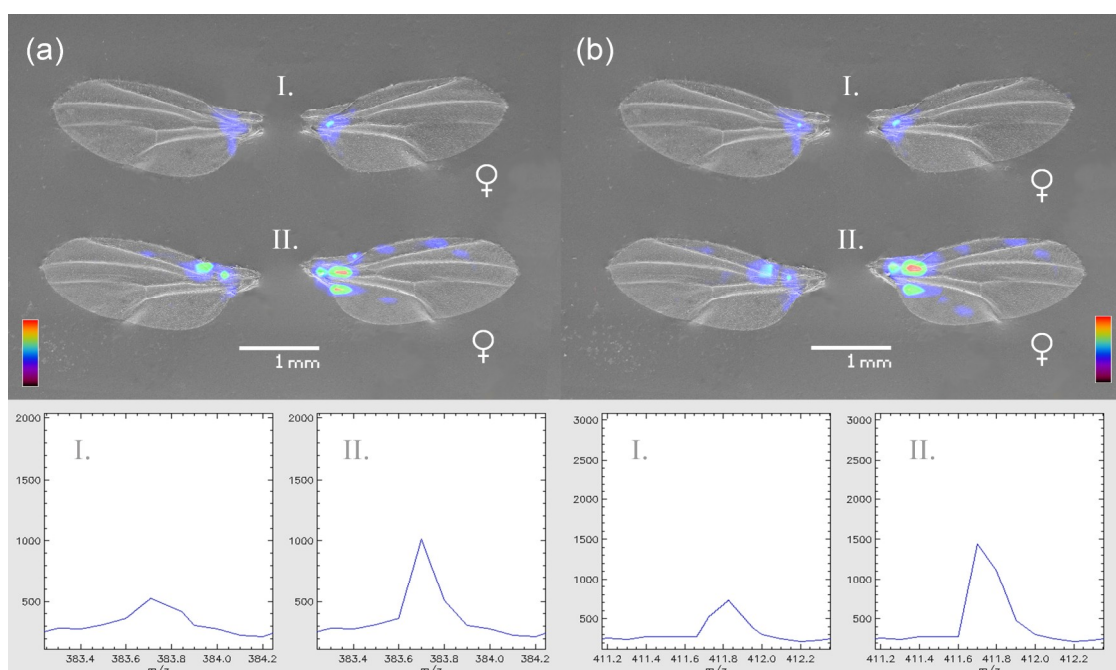
Obr. 6.25 SEM snímky dvou párů (6 dní starých) panenských octomilek obecných překrytých 2-D mapou intenzit signálů sledovaných analytů (BioMap). Měřeno v MALDI MSI pozitivním režimu s LiDHB matricí. (a) TGs m/z 810 – 820. (b) cVA m/z 349,4 – 349,9 ($[M+K]^+$).

I přes obtížnou ionizaci kutikulárních uhlovodíků byly samičí feromony zobrazeny v režimu MALDI-TOF s matricí LiDHB. Signály odpovídající těmto uhlovodíkům byly lokalizovány výhradně na samičích křídlech viz Obr. 6.26. V případě MALDI-TOF experimentů zaměřených na studium samičích feromonů však bylo nutné zvýšit počet laserových pulzů na jeden bod rastru (na 120 pulzů a více). To mimo jiné také potvrdilo upřednostňovanou ionizaci polárních sloučenin obsahujících molekuly kyslíku (jako jsou TGs [37]) vzhledem ke kutikulárním uhlovodíkům.

Na Obr. 6.26 jsou zobrazeny dva páry samičích křídel much octomilek obecných, která byla odstřižena co nejbližší k hrudi a fixována horní stranou křídel vzhůru na MALDI desku do oblasti mimo profilované jamky. Z Obr. 6.26 je patrná symetrická distribuce uhlovodíků lokalizovaná především do báze křídel. Obr. 6.26a znázorňuje distribuci samičího feromonu 7,11-HD, přičemž intenzita signálu tohoto dienu je na základě MS spekter v porovnání se samičím feromonem 7,11-ND viz

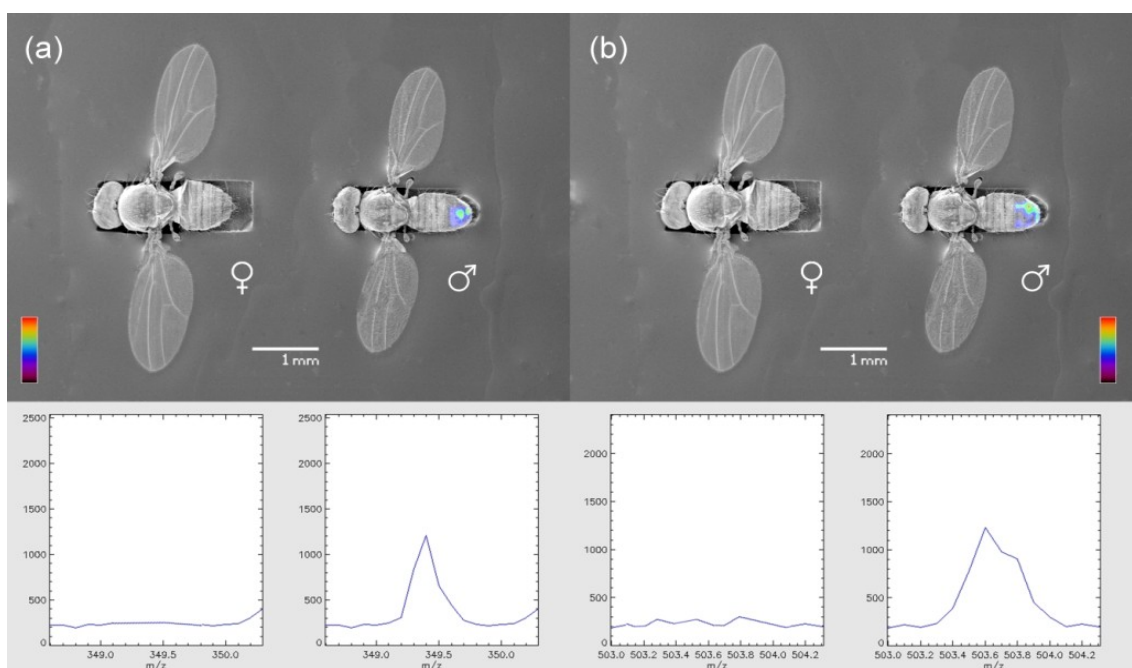
Obr. 6.26b obecně nižší. Z Obr. 6.26 dále vyplývá, kromě toho, že je distribuce obou dienů shodná, že se absolutní koncentrace samičích feromonů na povrchu křídel mezi jednotlivými samicemi poměrně významně liší. Tento závěr byl podpořený celou řadou provedených MALDI experimentů i SEM snímků potvrzujících homogenitu nanesené vrstvy matrice i shodnost morfologie báze křídel.

Symetrické signály samičích feromonů lokalizované v oblasti bází samičích křídel byly pozorovány i v případě MALDI-MSI experimentů s celými samicemi much octomilek fixovaných v profilovaných jamkách.

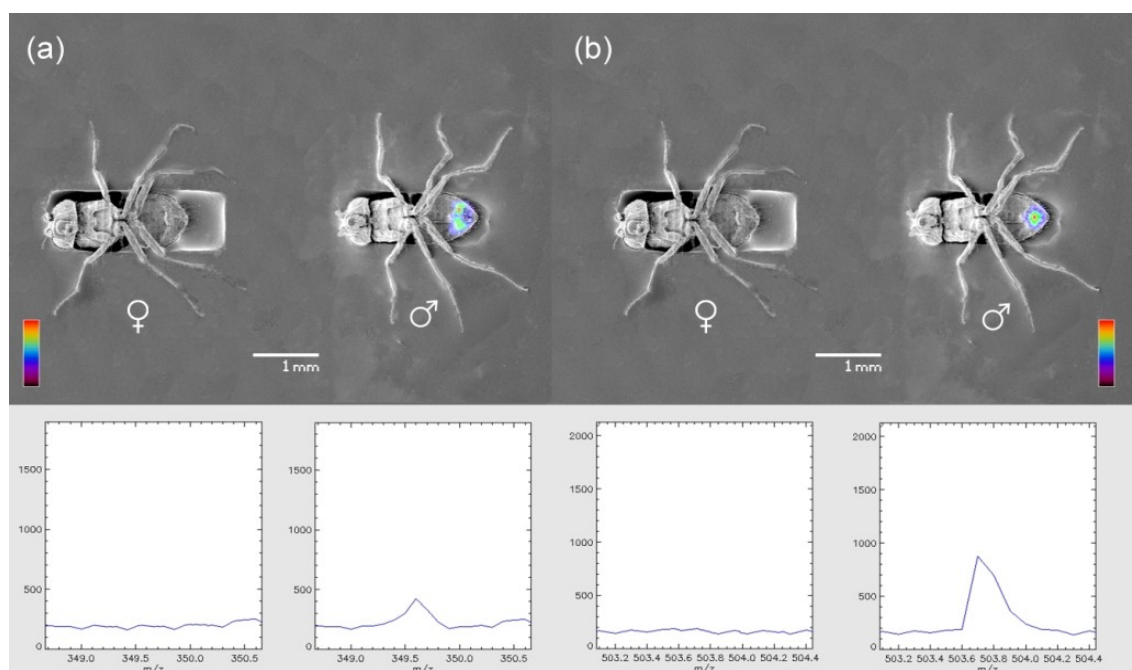


Obr. 6.26 SEM snímky dvou párů (6 dní starých) spárených octomilek obecných překrytých 2-D mapou intenzit signálů cVA (BioMap). Měřeno v MALDI MSI pozitivním režimu s LiDHB matricí. (a) Distribuce samičího feromonu 7,11-HD m/z 383,6 – 383,9 ($[M+Li]^+$). (b) Distribuce samičího feromonu 7,11-ND m/z 411,6 – 411,8 ($[M+Li]^+$).

LDI-TOF a MALDI-TOF MSI experimenty byly dále detailněji zaměřeny na studium samčích feromonů již zmíněného cVA a stejně tak CH503 [155]. Na Obr. 6.27 je znázorněný jeden pár panenských much, na kterém je zobrazena distribuce samčích cVA (Obr. 6.27a) a CH503 (Obr. 6.27b). V obou případech byly signály těchto dvou feromonů lokalizovány pouze do oblasti posledních tergitů samčího abdomenu s tím, že distribuce byla velmi podobná.

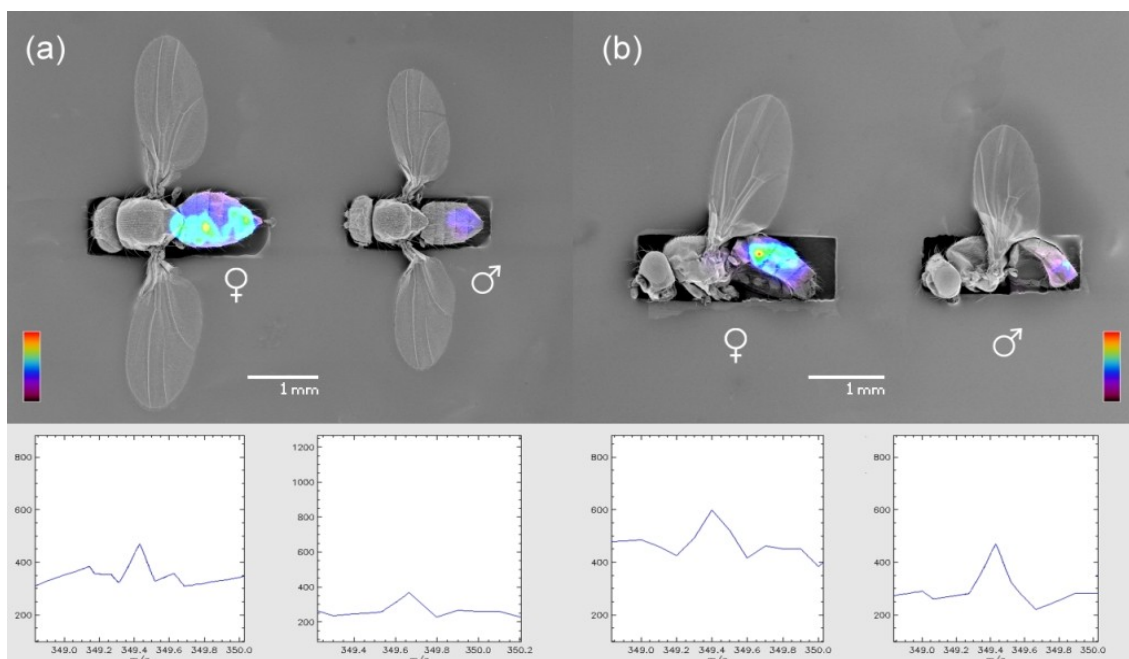


Obr. 6.27 SEM snímky jednoho páru (6 dní starých) panenských octomilek obecných překrytých 2-D mapou intenzit signálů cVA a CH503 (BioMap). Měřeno v LDI MSI pozitivním režimu. (a) cVA m/z 349,4 – 349,7 ($[M+K]^+$). (b) CH503 m/z 503,6 – 503,9 ($[M+K]^+$).



Obr. 6.28 SEM snímky jednoho páru (6 dní starých) panenských octomilek obecných překrytých 2-D mapou intenzit signálů cVA a CH503 (BioMap). Měřeno v MALDI MSI pozitivním režimu s LiDHB maticí. (a) cVA m/z 349,4 – 349,7 ($[M+K]^+$). (b) CH503 m/z 503,6 – 503,9 ($[M+K]^+$).

Obdobný experiment zaměřený na samčí feromony byl provedený na jiném páru panenských much, ovšem tak, že byla zobrazována spodní část much s nohama a celým genitálem (Obr. 6.28). A opět byla vizualizována distribuce samčího cVA (Obr. 6.28a) a CH5O3 (Obr. 6.28b). Na základě získané distribuce lze konstatovat, že vyústění žláz (popřípadě pouze jedné žlázy) produkujících cVA a CH5O3 je umístěné v těsné blízkosti samčího genitálu a že z tohoto místa dochází k difuzi těchto látek ve vrstvě kutikulárních lipidů do okolí.



Obr. 6.29 SEM snímky dvou párů (6 dní starých) spářených octomilek obecných překrytých 2-D mapou intenzit signálů cVA (BioMap). Měřeno v LDI MSI pozitivním režimu. (a) cVA m/z 349,3 – 349,5 ($[M+K]^+$) (b) cVA m/z 349,2 – 349,6 ($[M+K]^+$).

Kromě panenských much byly MALDI-MSI experimenty prováděny i na spářených octomilkách s cílem studia případného přenosu některých látek během kopulace. Na základě těchto experimentů byl zmapován přenos samčích feromonů resp. anti-atraktantu cVA (Obr. 6.29a) a feromonu CH5O3 (Obr. 6.29b). Jak je z porovnání Obr. 6.27 a Obr. 6.29 patrné, dochází během kopulace much k přenosu samčího cVA na horní část samičího abdomenu. Obr. 6.29 zobrazuje dva páry spářených much

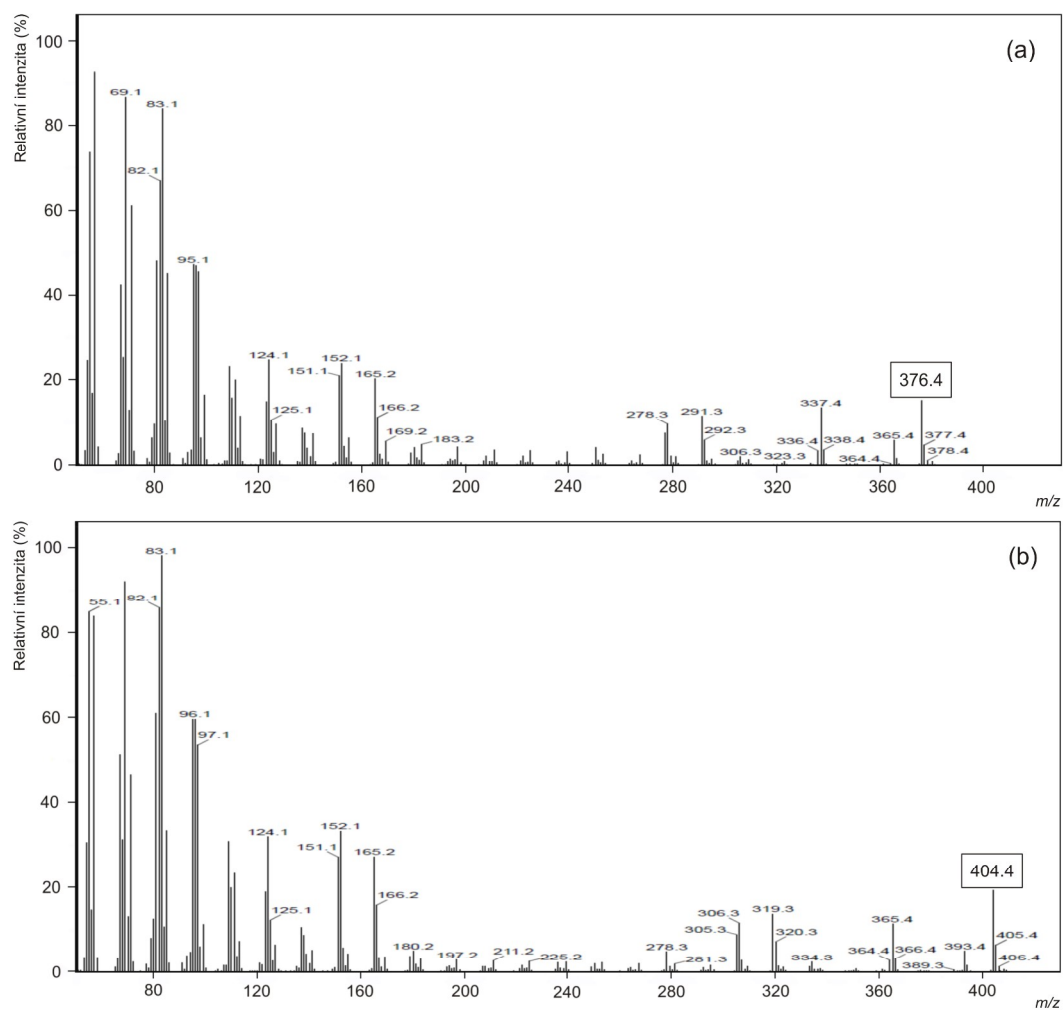
s distribucí cVA, která je po kopulaci lokalizována výhradně na horní části samčího abdomenu s tím, že nízké signály cVA jsou nadále přítomny na posledních tergitech samčího abdomenu. Prakticky totožná distribuce jako u cVA byla pozorována v případě spářených much i při přenosu feromonu CH₅O₃. Z výsledků vyplývá, že obě tyto specificky samčí látky jsou během kopulace přenášeny na samici zároveň, a slouží k určitému označování již spářené samice.

6.4.2 GC/MS hexanových extraktů částí těl octomilek obecných

Technika GS/MS byla v této práci použita k ověření dat získaných na základě MALDI-MSI experimentů much octomilek obecných, a to konkrétně samčích feromonů, jejichž distribuce byla na základě MSI analýzy lokalizována pouze v oblasti samčích křídel a dále samčího anti-atraktantu cVA, jehož přítomnost byla na základě MSI panenských much pozorována výhradně na samčím zadečku.

6.4.2.1 GC/MS hexanových extraktů samčích křídel octomilek obecných

Připravené hexanové extrakty ze samčích křídel octomilek obecných byly podrobeny standardní GC/MS analýze. Na základě získaného chromatogramu proběhla eluce odpovídající sledovanému samčímu feromonu 7,11-HD m/z 376,4 v čase 17,46 min (Obr. 6.30a). Eluce druhého dienu samčího feromonu 7,11-ND m/z 404,4 odpovídala času 19,87 min (Obr. 6.30b).

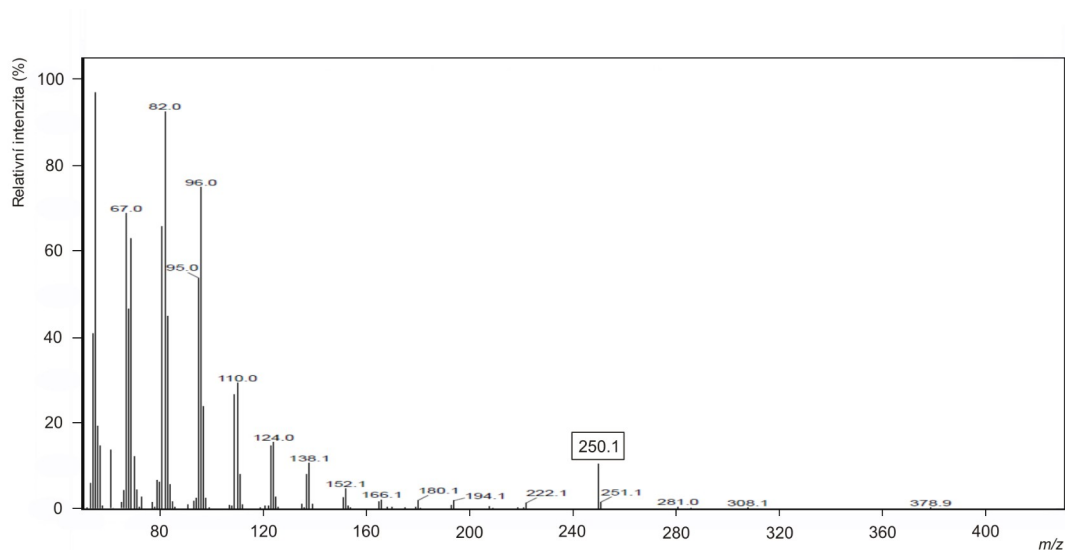


Obr. 6.30 GC/MS spektra hexanového oplachu získaného z 10 párů křídel dospělých samic much octomilek obecných. (a) Spektrum samičího feromonu 7,11-HD m/z 376,4. (b) Spektrum samičího 7,11-ND m/z 404,4.

6.4.2.2 GC/MS hexanových extraktů abdominálních částí octomilek obecných

GC/MS analýza hexanových extraktů samčích a samičích abdomenů na základě metody otěru kutikulární vrstvy lipidů byla provedena při shodných podmínkách jako v případě extraktů samičích křídel octomilek. Ze získaných chromatogramů byla potvrzena přítomnost sledovaného cVA pouze ve spektrech naměřených ze samčích hexanových extraktů. cVA byl ve spektrech přítomný jako iont s hmotností

m/z 250,1 vzniklý ztrátou kyseliny octové $[M^{+}-CH_3COOH]^{+}$ (Obr. 6.31). K fragmentaci přitom došlo během procesu ionizace. Retenční čas daného fragmentu byl 12,22 min.



Obr. 6.31 GC/MS spektrum zobrazující majoritní fragmentační iont m/z 250,1 $[M^{+}-CH_3COOH]^{+}$ samčího anti-atraktantu cVA analyzovaného ze vzorku hexanového oplachu získaného ze 14 dospělých samců much octomilek obecných.

6.4.3 MALDI-MSI čmeláka zemního

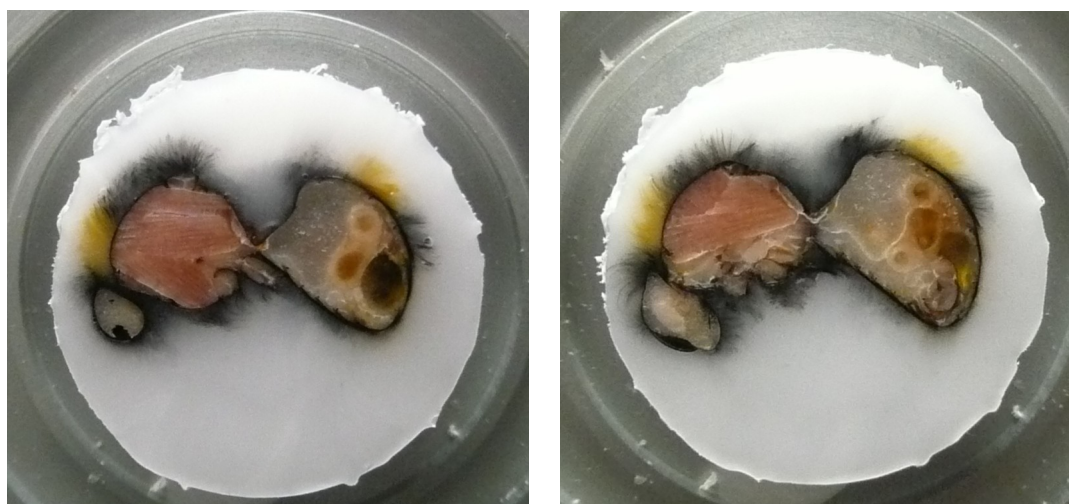
MSI analýza biologických vzorků v podobě kryomikrotomických řezů získává v současné době stále více pozornosti a je využívána v rámci analýz různorodých typů rostlinných i živočišných tkáňových vzorků, a to v rozsahu velikosti a komplexnosti řezu od jednotlivých orgánů až po řezy celých těl zvířat.

Kvalita získaných MSI dat přitom přímo úměrně souvisí s kvalitou analyzovaného kryomikrotomického řezu. Obecně platí, že čím je vzorek pro kryomikrotomické řezání prostorově větší, charakterem komplexnější, křehčí, nebo čím více obsahuje nevázané vody, tak tím obtížnější je získat dostatečně kvalitní a reprodukovatelný řez. V logice s výše napsaným je tak nejsnazším vzorkem k řezání rozměrově malý vzorek měkké tkáně a naopak nejobtížněji kryomikrotomicky zpracovatelný může být vzorek hmyzu nebo vzorek kosti a podobné biologické materiály.

Za účelem usnadnění přípravy kryomikrotomických řezů obtížně zpracovatelných vzorků je nutné využívat fixačního média, do kterého je vlastní vzorek před řezáním zalitý [176]. Fixační médium plní funkci určité podpory pro křehké tkáně a pomáhá předcházet jejich poškození během řezání a celému vzorku dodává určitou kompaktnost. Fixačního média se kromě uvedeného využívá také pro snazší upevnění vzorku na terč kryomikrotomu.

Za účelem MALDI-MSI experimentů s kryomikrotomickými řezy bylo v této práci využito nového typu fixačního média na bázi hydrofilního polymeru pHPMA [177,178], jehož vhodnost byla testována ve spojení s velmi obtížně kryomikrotomicky zpracovatelnými vzorky čmeláka zemního.

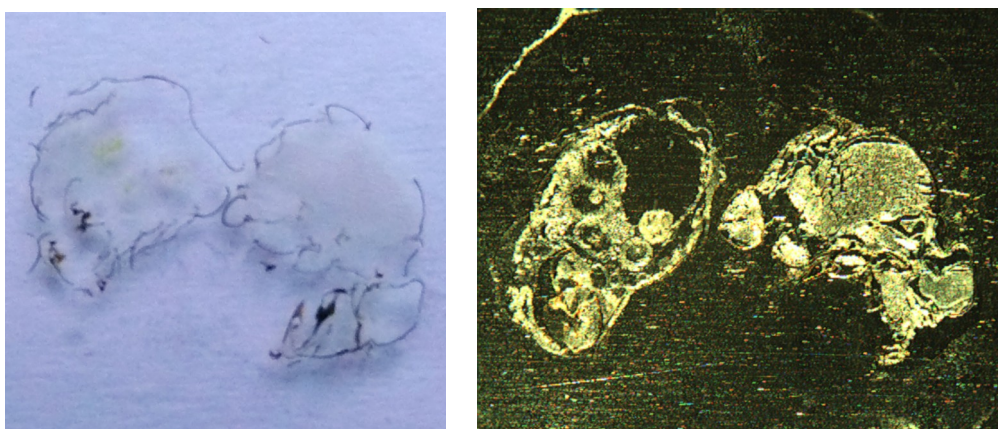
Pro testování fixačního média pHPMA byl vybrán na kryomikrotomu obtížně zpracovatelný vzorek samčího dospělého čmeláka zemního, který bez použití media prakticky nebylo možné nařezat na požadovanou tloušťku řezů (12 μm) vhodnou pro MALDI-MSI experimenty. Obtížnost přípravy řezů spočívala v tom, že tělo čmeláka bylo po zamrazení vzhledem k přítomnosti vzduchových vaků velmi nesoudržné. Další komplikací byla přítomnost tuhé kutikuly. Kombinace těchto faktorů vedla ke ztrátě kompaktnosti vzniklého kryomikrotomického řezu a k jeho rozpadnutí.



Obr. 6.32 Optické snímky dvou následných sagitálních řezů samčího dospělého čmeláka zemního fixovaného v médiu (15 % (w/w) MilliQ roztok pHPMA) na kovovém terči kryomikrotomu při teplotě -15°C .

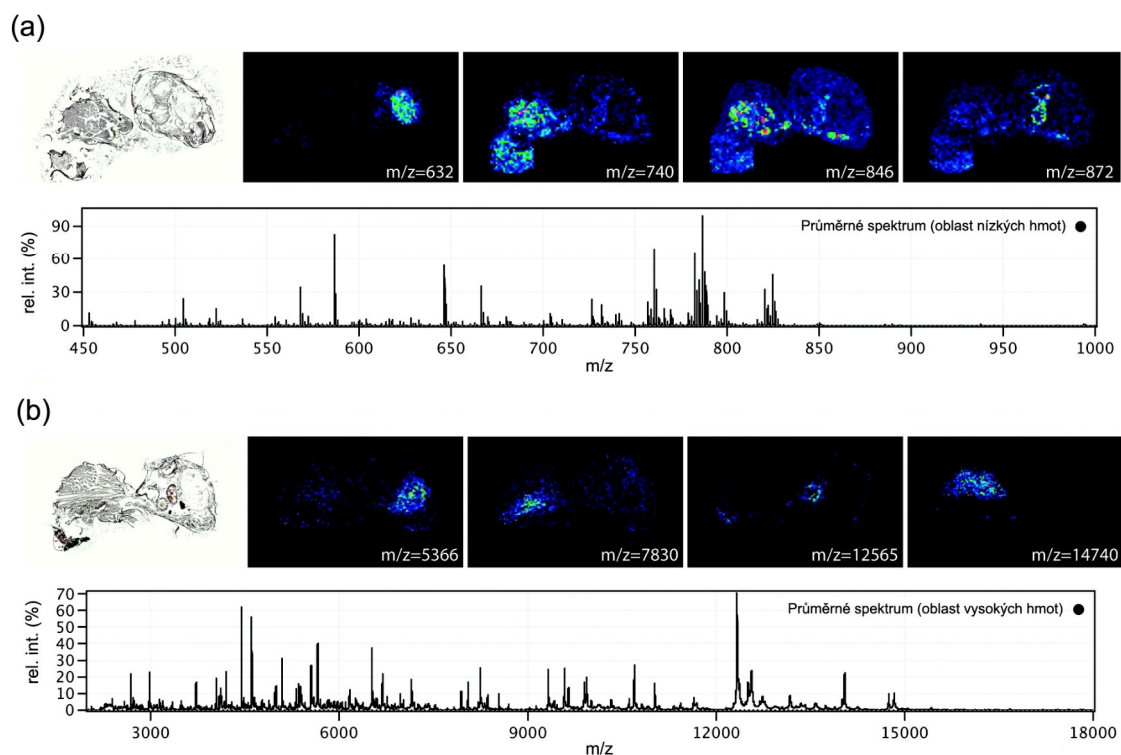
Na základě popsaného postupu přípravy čmeláka zemního, využívající jemné vákuum k nasátí vodného 15 % (w/w) roztoku pHPMA do těla hmyzu, se úspěšně podařilo zhotovit kryomikrotomické řezy. Na Obr. 6.32 jsou znázorněny konsektivní sagitální řezy samčím tělem čmeláka zemního fixovaného ve zmrzlém bloku fixačního média pHPMA.

Jak je z Obr. 6.32 patrné fixační medium se podařilo rozptýlit prakticky do celého těla čmeláka včetně hlavové části, což při řezání na kryomikrotomu zajistilo produkci kvalitních a kompaktních řezů, bez toho aniž by docházelo k vypadávání některých oddílů.



Obr. 6.33 Kryomikrotomické řezy těla čmeláka fixované na dvou různých typech vzorkovacích povrchů. (a) Kryomikrotomický řez fixovaný na vodivém podložním sklíčku ITO. (b) Kryomikrotomický řez fixovaný na kovové MALDI desce.

Na Obr. 6.33 jsou zobrazeny finální kryomikrotomické řezy tělem čmeláka fixované na dvou různých typech povrchů, a to na vodivých podložních sklíčkách ITO (Obr. 6.34a) a na kovové MALDI desce (Obr. 6.34b).



Obr. 6.34 Hmotnostní spektra z MALDI MSI experimentu kryomikrotomického řezu (zobrazovaném na ITO podložním sklíčku) samčího těla čmeláka zemního s aplikovaným 15 % (w/w) pHPMA fixačním médiem. (a) Průměrná MS spektra pro nízkou oblast hmotností. (b) Průměrná MS spektra pro vysokou oblast hmotností.

Získaná hmotnostní spektra (Obr. 6.34) z provedených MALDI-MSI experimentů kryomikrotomických řezů čmeláka zemního potvrdila vhodnost použití fixačního média pHPMA v 15 % (w/w) koncentraci pro analýzu látek jak v oblasti nízkých hmotností (Obr. 6.34a), tak z oblasti vysokých hmotností (Obr. 6.34b). Na Obr. 6.34a a Obr. 6.34b jsou zobrazena průměrná získaná hmotnostní spektra, která vykazují absenci jakýchkoliv píků vztahujících se k aplikovanému fixačnímu médiu pHPMA.

7. ZÁVĚR

ZÁVĚR

Disertační práce byla zaměřena na využití desorpčně ionizačních metod DESI, DAPPI a MALDI v hmotnostní spektrometrii za účelem studia různorodých biologických vzorků. Kromě toho byla součástí práce konstrukce univerzální platformy pro ambientní ionizační techniky v MS, na základě které byly realizovány experimenty v režimech DESI-MS a DAPPI-MS.

Vhodnost navrženého konstrukčního řešení univerzální platformy pro AIT byla potvrzena na základě série testů s modelovým analytem i reálnými biologickými vzorky. V případě modelového analytu bylo pracováno s rhodaminem B, který byl v DESI úspěšně využíván pro nastavení vhodné geometrie sprejeru vůči vzorku a atmosférickému vstupu MS. Rhodamin B byl dále využit k testování několika druhů vzorkovacích povrchů, na základě čehož byl jako nejvhodnější a nejuniverzálnější zvolen porézní teflon s pracovním označením PTFE 2. V případě biologických vzorků byly testovány vzorky rostlin oměje šalamounek a novorozeneckého mázku. DESI-MS experimenty byly zaměřeny na analýzu akonitinu z částí rostlin oměje. Akonitin byl v DESI-MS z rostlinné tkáně úspěšně analyzován, a to bez nutnosti zařazení kroku přípravy vzorku. Zkonstruovaná platforma byla v kombinaci s technikou DAPPI-MS testována na vzorcích novorozeneckého mázku, který byl pro analýzu připraven pomocí dvou extrakčních metod s označením FOLCH a MTBE. Na základě porovnání výsledků analýz poskytovaly vzorky získané extrakční metodou MTBE komplexnější spektra obsahující vyšší počet skupin lipidů při vyšších intenzitách signálů než u vzorků FOLCH. Za účelem provádění 1-D a 2-D analýzy vzorků s definovaným krokem posunu byla původně manuální platforma přestavěna na motorizovanou platformou ovládanou prostřednictvím uživatelského rozhraní hmotnostního spektrometru. Na základě výše uvedeného testování byla konstrukce manuální i motorizované platformy v režimech DESI i DAPPI z pohledu uživatele zhodnocena jako velice dobře ovladatelná a robustní ve všech svých prvcích a polohách a zároveň vykazující vysokou variabilitu, co do možnosti analýzy různorodých typů i velikostí vzorků.

Metoda DESI-MS byla v této práci využita v kombinaci s modelovým analytem rhodaminem B ke studii zaměřené na objasnění základních desorpčně ionizačních procesů, ke kterým dochází při DESI experimentech. V rámci studie byla potvrzena

existence povrchových struktur, do kterých se na vzorkovacím povrchu formuje analyt pod vlivem primárních kapičky DESI spreje. Přítomnost těchto formací, které byly zvýrazněné pomocí Fe_3O_4 nanočástic přidávaných do SK a zobrazené prostřednictvím SEM snímků, byla potvrzena na skleněných i teflonových vzorkovacích površích. Stejně tak byla potvrzena shodná orientace těchto struktur, jejichž počátek byl vždy v místě dopadu primárních kapek spreje. Shodné formace byly pozorovány jak při experimentech probíhajících s vloženým vysokým napětím (DESI), tak u experimentů v režimu EASI tedy bez vloženého napětí na sprejeru. Žádné z těchto formací přitom nebyly pozorovány v případě nano-DESI experimentů, při kterých bylo vloženo vysoké napětí na sprejer, ale nebyl používán nebulizační plyn. Z toho vyplývá, že vznik povrchových struktur není závislý na vnějším elektrostatickém poli, ale výhradně na hydrodynamickém chování kapek SK. Tvary a zakřivení povrchových formací jsou tak způsobena kinetickou energií kapek získanou díky přítomnosti nebulizačního plynu při sprejování SK. Experimenty tak v obecné rovině potvrdily robustnost v technice DESI všeobecně uznávaného „Droplet pick up“ mechanismu.

Prostřednictvím techniky DAPPI-MS byla vypracována metoda analýzy melaminu v mléčných produktech lišících se obsahem tuku. Vzorky mlék a smetany pro DAPPI-MS analýzu byly připraveny přidavkem definovaného množství melaminu odpovídajícího výsledné koncentraci 0,1 mg/kg; 1,0 mg/kg a 2,0 mg/kg a konstantního množství 2,3-DAP při koncentraci 6,0 mg/kg, který byl zvolen jako interní standard. Vzhledem k přítomnosti interferujícího kontaminantu z matrice vzorku, který vykazoval shodnou nominální hmotnost jako melamin, bylo nutné ve spojení s DAPPI ionizačním zdrojem využít hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením. Vhodnost 2,3-DAP jako interního standardu byla experimentálně ověřena na základě sestavené kalibrační křivky, která ve sledovaném koncentračním rozsahu melaminu od 0,1 mg/kg do 2 mg/kg vykazovala linearitu. Nicméně na základě směrnice závislosti poměrů absolutních intenzit signálů analytu a interního standardu z naměřených DAPPI-MS dat analyzovaných vzorků mlék a smetany byla pozorována výrazná odlišnost v hodnotách těchto směrnice. Řádově nižší hodnoty směrnice závislosti vykazovaly v porovnání se vzorky mlék vzorky smetan, u kterých na základě MS dat docházelo k výraznému nárůstu absolutních intenzit signálu interního standardu, a to vlivem matričních efektů. Ukázalo se tak, že se 2,3-DAP jako interní standard chová v případě DAPPI-MS

analýzy různých druhů mléčných produktů, tj. v prostředí vlivu různých matričních efektů, odlišně od melaminu. Z čehož vyplývá, že metoda DAPPI-MS analýzy melaminu ve vzorcích mléčných produktů dostatečně neřeší matriční efekty a i přes její relativně dobrou citlivost nelze metodu využít pro rutinní analýzu vzhledem k tomu, že by kvantifikace byla významně zatížena chybou v závislosti na analyzovaném druhu mléčného produktu. Uvedené nedostatky vypracované metody by teoreticky mohli být odstraněny na základě dodatečné optimalizace metody. Ve stávající podobě však není možné danou metodu pro kvantifikaci využívat.

MALDI-MSI experimenty prezentované v této práci byly založené na dvou rozdílných přístupech zpracování a analýzy biologických vzorků, a to konkrétně kryomikrotomických řezů čmeláka zemního a intaktních jedinců much octomilek obecných.

LDI/MALDI-MSI experimenty zaměřené na studium kutikulárních lipidů a látek chemické komunikace octomilek obecných potvrdily, že navržený design speciálních MALDI desek zcela splnil svojí funkci. Díky profilovaným jamkám bylo na MALDI desce možné reprodukovatelně fixovat mouchy s požadovanou prostorovou orientací jednotlivých částí jejich těl a stejně tak provádět MSI experimenty much dle potřeby fixovaných v dorzální nebo laterální pozici těl. V případě LDI-TOF-MSI experimentů octomilek obecných obsahovala získaná spektra silné signály TGs s tím, že zastoupení iontů kutikulárních uhlovodíků bylo velmi slabé. Pro studium kutikulárních uhlovodíků, konkrétně samičích feromonů 7,11-HD a 7,11-ND tak bylo daleko vhodnější pracovat v režimu MALDI-TOF s maticí LiDHB. V režimech LDI/MALDI-TOF byly úspěšně studovány povrchy pannenských a stejně tak i spárených much za účelem zmapování distribuce a přenosu samčích anti-atraktantů cVA a CH5O3. Správnost experimentálně získané distribuce sledovaných analytů lokalizovaných v horní části zadečku, tak jak je zobrazeno na SEM snímcích překrytých 2-D mapami intenzit signálů analytů a stejně tak přenos samčích anti-atraktantů na samici během kopulace, byla potvrzena na základě skutečnosti, že se jedná o distribuci, která je biologicky podmíněná. Zadeček much octomilek obecných je pokrytý velkým počtem vyústění exogenních žláz. Látky produkované těmito žlázami jsou potom rozpuštěny resp. fixovány v kutikulární vrstvě lipidů, která pokrývá celý povrch zadečku a umožňuje tak detekci těchto sloučenin i přesto, že jsou dané

látky obecně za zvolených experimentálních podmínek MSI těkavé. Kromě toho byla MALDI-MSI analýza těkavých látek z povrchu much usnadněna přítomností deponované matrice, díky které docházelo k další fixaci analytů na povrchu. K podpoření získaných MSI dat byly vypracovány postupy přípravy hexanových extraktů, a to jak klasickým způsobem, tak metodou otěru, které se ukázaly jako zcela vyhovující pro daný typ sledovaných analytů. Na základě provedených GC/MS experimentů vzorků extraktů samičích křídel byla získána hmotnostní spektra odpovídající samičím feromonům 7,11-HD a 7,11-ND a stejně tak v případě analyzovaných extraktů připravených metodou otěru byla potvrzena přítomnost anti-atraktantu cVA výhradně v samčím vzorku. Výsledky provedených GC/MS analýz tak byly v souladu se závěry z MALDI-MSI experimentů. Jako důsledek zvoleného konceptu projektu designovaného jako 2-D MSI 3-D objektu byl při MSI pozorován posun hmotností m/z , způsobený zejména díky nehomogenitám v nabíjení a vybíjení povrchu během zobrazování. Jak se však ukazuje, lze tento projev do budoucna eliminována s pomocí vhodného softwaru využívajícího lock-mass korekce pro každý bod rastru analyzované oblasti vzorku.

MALDI-MSI experimenty se vzorky čmeláka zemního byly zaměřeny na ověření vhodnosti nového fixačního média na bázi pHPMA určeného pro MSI analýzy. Vodný roztok polymeru pHPMA byl úspěšně připraven a optimalizován na výslednou 15 % (w/w) koncentraci, která byla zvolena na základě vhodné viskozity a tím i zpracovatelnosti roztoku pro daný typ analýzy. Fixační médium bylo použito jako podpora při kryomikrotomickém řezání obtížně zpracovatelných biologických vzorků čmeláka zemního. Obtížnost získání kvalitních kryomikrotomických řezů těla čmeláka spočívala v přítomnosti velkého počtu vzdušných vaků vzdušnicové soustavy a zároveň tuhé kutikuly. Z toho důvodu bez použití vhodného fixačního média a správného postupu jeho aplikace docházelo při řezání těla k rozpadu řezu z důvodu jeho křehkosti a nekompaktnosti. Využitím jemného vákua při aplikaci roztoku polymeru pHPMA na vzorek čmeláka bylo dosaženo kompletního smáčení jeho povrchu a zároveň i nasátí polymeru do celé vzdušnicové soustavy. Tím tak byly kompletně vyplněny dutiny v těle čmeláka, čímž dostal kryomikrotomický řez svoji kompaktnost a bylo ho tak možné použít pro MSI analýzy. Na základě provedených MSI experimentů pHPMA neposkytoval vlastní hmotnostní spektra v podobě vysokého pozadí a stejně tak ani

nezpůsoboval nijak významné potlačování ionizace sledovaných analytů v širokém hmotnostním rozsahu. Polymer pHPMA se tak ukázal jako vhodné médium pro analýzu širokého spektra skupin látek, a to jak v oblasti nízkých molekulových hmotností, do které můžeme řadit lipidy a metabolity, tak i v oblasti vysokých hmotností při analýzách peptidů a proteinů.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F.: Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal. Chem.* **57**, 2935-2939 (1985).
- 2) Karas, M.; Hillenkamp, F.: Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301 (1988).
- 3) Brulet, M.; Seyer, A.; Edelman, A.; Brunelle, A.; Fritsch, J.; Ollero, M.; Laprevote, O.: Lipid Mapping of Colonic Mucosa by Cluster TOF-SIMS Imaging and Multivariate Analysis in cfr Knockout Mice. *J. Lipid Res.* **51**, 3034-3045 (2010).
- 4) Bich, C.; Vianello, S.; Guérineau, V.; Touboul, D.; De La Porte, S.; Brunelle, A.: Compatibility Between TOF-SIMS Lipid Imaging and Histological Staining on a Rat Brain Section. *Surf. Interface Anal.* **45**, 260-263 (2013).
- 5) Passarelli, M. K.; Winograd, N.: Lipid Imaging with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS). *Biochim. Biophys. Acta.* **1811**, 976-990 (2011).
- 6) Brunelle, A.; Laprévote, O.: Lipid Imaging with Cluster Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 31-35 (2009).
- 7) Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G.: Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science.* **306**, 471-473 (2004).
- 8) Venter, A.; Nefliu, M.; Cooks, R. G.: Ambient Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Trends in Anal. Chem.* **27**, 284-290 (2008).
- 9) Yamashita, M.; Fenn, J. B.: Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451- 4459 (1984).

- 10) Shiea, J.; Huang, M. Z.; Hsu, H. J.; Lee, C. Y.; Yuan, C. H.; Beech, I.; Sunner, J.: Electrospray-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for Direct Ambient Analysis of Solids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 3701-3704 (2005).
- 11) Sampson, J. S.; Hawkridge, A. M.; Muddiman, D. C.: Generation and Detection of Multiply Charged Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization (MALDESI) Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 1712-1716 (2006).
- 12) Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N.: Desorption Sonic Spray Ionization for (High) Voltage-Free Ambient Mass Spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 2901-2905 (2006).
- 13) Nemes, P.; Vertes, A.: Laser Ablation Electrospray Ionization for Atmospheric Pressure, in Vivo, and Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 8098-8106 (2007).
- 14) Covey, T. R.; Lee, E. D.; Bruins, A. P.; Henlon, J. D.: Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **58**, 1451-1461 (1986).
- 15) Prakash, C.; Shaffer, C. L.; Nedderman, A.: Analytical Strategies for Identifying Drug Metabolites. *Mass Spectrometry Reviews.* **26**, 340–69 (2007).
- 16) Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D.: Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Anal. Chem.* **77**, 2297-2302 (2005).
- 17) Takats, Z.; Cotte-Rodriguez, I.; Talaty, N.; Chen, H. W.; Cooks, R. G. Direct Trace Level Detection of Explosives on Ambient Surfaces by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chem. Commun.* **15**, 1950-1952 (2005).

- 18) Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; Arvola, V.; Kotiaho, T.; Ketola, R. A.; Franssila, S.; Kauppila, T. J.; Kostianen, R.: Desorption Atmospheric Pressure Photoionization. *Anal. Chem.* **79**, 7867-7872 (2007).
- 19) Eikel, D.; Vavrek, M.; Smith, S.; Bason, C.; Yeh, S.; Korfmacher, W. A.; Henion, J. D.: Liquid Extraction Surface Analysis Mass Spectrometry (LESA-MS) as a Novel Profiling Tool for Drug Distribution and Metabolism Analysis: The Terfenadine Example. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 3587-3596 (2011).
- 20) Laiko, V. V.; Baldwin, M. A.; Burlingame, A. L.: Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 652-657 (2000).
- 21) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.: Protein and Polymer Analysis up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151-153 (1988).
- 22) Krüger, R.; Karas, M.: Formation and Fate of Ion Pairs During MALDI Analysis: Anion Adduct Generation as an Indicative Toll to Determine Ionization Processes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, 1218-1226 (2002).
- 23) Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J.: Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **69**, 4751-4760 (1997).
- 24) Chan, K.; Lanthier, P.; Sandhu, J. K.; Stanimirovis, D.; Li, J.: MALDI Mass Spectrometry Imaging of Gangliosides in Mouse Brain Using Ionic Liquid Matrix. *Anal. Chim. Acta.* **639**, 57-61 (2009).
- 25) Miki, A.; Katagi, M.; Kamata, T.; Zaitse, K.; Tatsuno, M.; Nakanishi, H.; Takubo, T.; Suzuki, K.: MALDI-TOF and MALDI-FTICR Imaging Mass Spectrometry of Methamphetamine Incorporated into Hair. *J. Mass Spectrom.* **46**, 411-416 (2011).

- 26) Pól, J.; Strohalm, M.; Havlíček, V.; Volný, M.: Molecular Mass Spectrometry Imaging in Biomedical and Life Science Research. *Histochem. Cell Biol.* **134**, 423-443 (2010).
- 27) Gong, W.; Elitzin, V. L.; Janardhanam, S.; Wilkins, C. L.; Fritsch, I.: Effect of Laser Fluence on Laser Desorption Mass Spectra of Organothiol Self-Assembled Monolayers on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 769-770 (2001).
- 28) Gong, W.; Elitzin, V. L.; Zenobi, R.; Knochenmuss, R.: Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 337-366 (1999).
- 29) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M.: Imaging Mass Spectrometry: A New Tool to Investigate the Spatial Organization of Peptides and Proteins in Mammalian Tissue Sections. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 676-681 (2002).
- 30) Chen, Y.; Liu, Y.; Allegood, J.; Wang, E.; Cachón-González, B.; Cox, T. M.; Merrill, A. H. Jr.; Sullards, M. C.: Imaging MALDI Mass Spectrometry of Sphingolipids Using an Oscillating Capillary Nebulizer Matrix Application System. *Methods Mol. Biol.* **656**, 131-146 (2010).
- 31) Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C.: Sublimation as a Method of Matrix Application for Mass Spectrometric Imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1646-1652 (2007).
- 32) Chaurand, P.; Cornett, D. S.; Angel, P. M.; Caprioli, R. M.: From Whole-Body Sections Down to Cellular Level, Multiscale Imaging of Phospholipids by MALDI Mass Spectrometry. *Mol. Cell Proteomics.* **10**, 1-11 (2011).
- 33) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S.: In Situ Structural Characterization of Phosphatidylcholines in Brain Tissue Using MALDI-MS/MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 2052-2056 (2005).

- 34) Khatib-Shahidi, S.; Andersson, M.; Herman, J. L.; Gillespie, T. A.; Caprioli, R. M.: Direct Molecular Analysis of Whole-Body Animal Tissue Sections by Imaging MALDI Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **78**, 6448-6456 (2006).
- 35) Jackson, S. N.; Woods, A. S.: Direct Profiling of Tissue Lipids by MALDI-TOF MS. *J. Chromatogr. B.* **877**, 2822-2829 (2009).
- 36) Goto-Inoue, N.; Hayasaka, T.; Taki, T.; Gonzalez, T. V.; Setou, M.: A New Lipidomics Approach by Thin-Layer Chromatography-Blot-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry for Analyzing Detailed Patterns of Phospholipid Molecular Species. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 7096-7101 (2009).
- 37) Vrkoslav, V.; Muck, A.; Cvačka, J.; Svatoš, A.: MALDI Imaging of Neutral Cuticular Lipids in Insects and Plants. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 220-231 (2010).
- 38) Goodwin, R. J.; Pennington, S. R.; Pitt, A. R.: Protein and Peptides in Pictures: Imaging with MALDI Mass Spectrometry. *Proteomics.* **8**, 3785-3800 (2008).
- 39) Groseclose, M. R.; Andersson, M.; Hardesty, W. M.; Caprioli, R. M.: Identification of Proteins Directly from Tissue: In Situ Tryptic Digestions Coupled with Imaging Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **42**, 254-262 (2007).
- 40) Yao, I.; Sugiura, Y.; Matsumoto, M.; Setou, M.: In Situ Proteomics with Imaging Mass Spectrometry and Principal Component Analysis in the Scrapper-Knockout Mouse Brain, *Proteomics.* **8**, 3692-3701 (2008).
- 41) Stoeckli, M.; Staab, D.; Schweitzer, A.: Compound and Metabolite Distribution Measured by MALDI Mass Spectrometric Imaging in Whole-Body Tissue Sections. *Int. J. Mass Spectrom.* **260**, 195-202 (2007).
- 42) Zaima, N.; Hayasaka, T.; Goto-Inoue, N.; Setou, M.: Imaging of Metabolites by MALDI Mass Spectrometry. *J. Oleo Sci.* **58**, 415-419 (2009).

- 43) Sugiura, Y.; Setou, M.: Imaging Mass Spectrometry for Visualization of Drug and Endogenous Metabolite Distribution: Toward in Situ Pharmacometabolomes. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **5**, 31-43 (2010).
- 44) Laiko, V. V.; Moyer, S. C.; Cotter, R. J.: AP MALDI/Ion Trap MS. *Anal. Chem.* **72**, 5239-5243 (2000).
- 45) Konn, D. O.; Murrell, J.; Despeyroux, D.; Gaskell, S. J.: Comparison of the Effects of Ionization Mechanism, Analyte Concentration, and Ion „Coll-Times“ on the Internal Energies of Peptide Ions Produced by Electrospray and Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 743-751 (2005).
- 46) Wiseman, J. M.; Ifa, D. R.; Venter, A.; Cooks, R. G.: Ambient Molecular Imaging by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Nat. Protoc.* **3**, 517-524 (2008).
- 47) Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Cooks, R. G.: Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J. Mass Spectrom.* **40**, 1261-1275 (2005).
- 48) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M.: Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Bimolecules. *Science.* **246**, 64-71 (1989).
- 49) Karas, M.; Hillenkamp, F.: Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301 (1988).
- 50) Costa, A. B.; Cooks, R. G.: Simulated Splashes: Elucidating the Mechanism of Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chem. Phys. Lett.* **464**, 1-8 (2008).

- 51) Volny, M.; Venter, A.; Smith, S. A.; Pazzi, M.; Cooks, R. G.: Surface Effects and Electrochemical Cell Capacitance in Desorption Electrospray Ionization. *Analyst*. **133**, 525-531 (2008).
- 52) Li, K. Y.; Tu, H.; Ray, A. K.: Charge Limits on Droplets during Evaporation. *Langmuir*. **21**, 3786–3794 (2005).
- 53) Gamero-Castano, M.; Fernandez de la Mora, J.: Mechanisms of Electrospray Ionization of Singly and Multiply Charged Salt Clusters. *Anal. Chim. Acta*. **406**, 67-91 (2000).
- 54) Chen, H.; Talaty, N. N.; Takats, Z.; Cook, R. G.: Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry for High-Throughput Analysis of Pharmaceutical Samples in the Ambient Environment. *Anal. Chem.* **77**, 6915-6927 (2005).
- 55) Talaty, N. N.; Takats, Z.; Cooks, R. G.: Rapid in Situ Detection of Alkaloids in Plant Tissue Under Ambient Conditions Using Desorption Electrospray Ionization. *Analyst*. **130**, 1624-1633 (2005).
- 56) Ifa, D. R.; Manicke, N. E.; Rusine, A. L.; Cooks, R. G.: Quantitative Analysis of Small Molecules by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry from Polytetrafluoroethylene Surfaces. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 503-510 (2008).
- 57) Berkel, G. J.; Ford, M. J.; Deibel, M. A.: Thin-Layer Chromatography and Mass Spectrometry Coupled Using Desorption Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* **77**, 1207-1215 (2005).
- 58) Dill, A. L.; Ifa, D. R.; Manicke, N. I.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G.: Multivariate Statistical Differentiation of Renal Cell Carcinomas Based on Lipidomic Analysis by Ambient Ionization Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 2969-2878 (2010).

- 59) Ellis, S. R.; Wu, C.; Deeley, J. M.; Zhu, X.; Truscott, R. J.; Panhuis, M.; Cooks, R. G.; Mitchell, T. W.; Blanksby, S. J.: Imaging of Human Lens Lipids by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **21**, 2095-2104 (2010).
- 60) Cooks, R. G.; Manicke, N. E.; Dill, A. L.; Eberlin, L. S.; Costa, A. B.; Wang, H.; Huang, G.; Ouyang, Z.: New Ionization Methods and Miniature Mass Spectrometers for Biomedicine: DESI Imaging for Cancer Diagnostics and Paper Spray Ionization for Therapeutic Drug Monitoring. *Faraday Discuss.* **149**, 247-267 (2011).
- 61) Costa, A. B.; Cooks, R. G.: Simulated Splashes: Elucidating the Mechanism of Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chem. Phys. Lett.* **464**, 1-8 (2008).
- 62) Takats, Z.; Cotte-Rodriguez, I.; Talaty, N.; Chen, H. W.; Cooks, R. G.: Direct, Trace Level Detection of Explosives on Ambient Surfaces by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chem. Commun.* **15**, 1950-1952 (2005).
- 63) Qiu, B.; Luo, H.: Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry of DNA Nucleobases: Implications for a Liquid Film Model. *J. Mass Spectrom.* **44**, 772-779 (2009).
- 64) Venter, A.; Sojka, P. E.; Cooks, R. G.: Droplet Dynamics and Ionization Mechanisms in Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **78**, 8549-8555 (2006).
- 65) Costa, A. B.; Cooks, R. G.: Simulation of Atmospheric Transport and Droplet-Thin Film Collisions in Desorption Electrospray Ionization. *Chem. Commun.* **38**, 3915-3917 (2007).

- 66) Nefliu, M.; Smith, J. N.; Venter, A.; Cooks, R. G.: Internal Energy Distributions in Desorption Electrospray Ionization (DESI). *Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 420-427 (2008).
- 67) Benassi, M.; Wu, C. P.; Nefliu, M.; Ifa, D. R.; Volny, M.; Cooks, R. G.: Redox Transformation in Desorption Electrospray Ionization. *Int. J. Mass Spectrom.* **280**, 235-240 (2009).
- 68) Pasilis, S. P.; Kertesz, V.; Van Berkel, G. J.: Unexpected Analyte Oxidation During Desorption Electrospray Ionization – Mass spectrometry. *Anal. Chem.* **80**, 1208-1214 (2008).
- 69) Wood, M. C.; Busby, D. K.; Farnsworth, P. B.: Microscopic Imaging of Glass Surfaces Under the Effects of Desorption Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* **81**, 6407-6415 (2009).
- 70) Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; Arvola, V.; Kotiaho, T.; Ketola, R. A.; Franssila, S.; Kauppila, T. J.; Kostianen, R.: Desorption Atmospheric Pressure Photoionization. *Anal. Chem.* **79**, 7867-7872 (2007).
- 71) Kauppila, T. J.; Kuuranne, T.; Meurer, E. C.; Eberlin, M. N.; Kotiaho, T.; Kostianen, R.: Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry (APPIMS) - Ionization Mechanism and the Effect of Solvent on the Ionization of Naphthalenes. *Anal. Chem.* **74**, 5470-5479 (2002).
- 72) Kauppila, T. J.; Arvola, V.; Haapala, M.; Pol, J.; Aalberg, L.; Saarela, V.; Franssila, S.; Kotiaho, T.; Kostianen, R.: Direct Analysis of Illicit Drugs by Desorption Atmospheric Pressure Photoionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 979-985 (2008).

- 73) Luosujarvi, L.; Arvola, V.; Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; Franssila, S.; Kostinen, R.; Kotiaho, T.; Kauppila, T. J.: Desorption Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry in drug analysis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **34**, 25-29 (2008).
- 74) Suni, N. M.; Aalto, H.; Kauppila, T. J.; Kotiaho, T.; Kostinen, R.: Analysis of Lipids with Desorption Pressure Photoionization-Mass Spectrometry (DAPPI-MS) and Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (DESI-MS). *J. Mass Spectrom.* **47**, 611-619 (2012).
- 75) Luosujarvi, L.; Arvola, V.; Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; Franssila, S.; Kotiaho, T.; Kostinen, R.; Kauppila, T. J.: Desorption and Ionization Mechanisms in Desorption Atmospheric Pressure Photoionization. *Anal. Chem.* **80**, 7460-7466 (2008).
- 76) Saarela, V.; Haapala, M.; Kostinen, R.; Kotiaho, T.; Franssila, S.: Microfluidic Heated Gas Jet Shape Analysis by Temperature Scanning. *J. Micromech. Microeng.* **19**, 1-10 (2009).
- 77) Stephens, W. E.: A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Phys. Rev.* **69**, 691-691 (1946).
- 78) Vestal, M. L.; Campbell, J. M.: Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Methods Enzymol.* **402**, 79-108 (2005).
- 79) Brown, R. S.; Lennon, J. J.: Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **67**, 1998-2003 (1995).
- 80) Paul, W.; Steinwedel, H.: Ein Neues Massenspektrometer Ohne Magnetfeld. *Z. Naturforsch.* **8**, 448 -450 (1953).

- 81) Church, D. A.: Storage-Ring Ion Trap Derived From the Linear Quadrupole Radiofrequency Mass Filter. *J Appl. Phys.* **40**, 3127-3134 (1969).
- 82) Deutch, B. U.; Jacobsen, F. M.; Andersen, L. H.; Hvelplund, P.; Knudsen, H.; Holzscheiter, M. H.; Charlton, M.; Laricchia, G.: Antihydrogen Production by Positronium-Antiproton Collisions in an Ion Trap. *Physica Scripta*. **22**, 248-255 (1988).
- 83) Stafford, G. Jr.: Ion Trap Mass Spectrometry: A Personal Perspective. *J. Am. Soc. Mass Spec.* **13**, 589-596 (2002).
- 84) Dolnikowski, G. G.; Kristo, M. J.; Enke, C. G.; Watson, J. T.: Ion-Trapping Technique for Ion Molecule Reaction Studies in the Center Quadrupole of a Triple Quadrupole Mass-Spectrometer. *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* **82**, 1-15 (1988).
- 85) Douglas, D. J.; Frank, A. J.; Dunmin, M.: Linear Ion Traps in Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 1-29 (2005).
- 86) Verner, P.: Lineární iontová past a její aplikace v proteomické analýze. *Chem. Listy*. **99**, 937-942 (2005).
- 87) Quarmby, S. T.; Yost, R. A.: Fundamental Studies of Ion Injection and Trapping of Electrosprayed Ions in a Quadrupole Ion Trap. *Int. J. Mass Spec.* **190**, 81-102 (1999).
- 88) Schwartz, J. C.; Senko, M. W.; Syka, J. E. P.: A Two-Dimensional Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, 659-669 (2002).
- 89) Kingdon, K. H.: A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Phys. Rev.* **21**, 408-418 (1923).
- 90) Makarov, A.: Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156-1162 (2000).

- 91) Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Cooks, R. G.: The Orbitrap: A New Mass Spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **40**, 430-443 (2005).
- 92) Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Jackson, G. S.: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Primer. *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 1-35 (1998).
- 93) Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Detection: Principles and Experimental Configurations. *IJMS*. **215**, 59-75 (2002).
- 94) Jagtap, R. N.; Ambre, A. H.: Overview Literature on Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS): Basic and Its Applications in Characterizing Polymeric Materials. *Bull. Mater. Sci.* **28**, 515-528 (2005).
- 95) Hanston, S. D.: Mass Spectrometry of Polymers and Polymer Surfaces. *Chem. Rev.* **101**, 527-569 (2001).
- 96) Dale, M. J.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R.: Two-Phase Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization: Matrix Selection and Sample Pretreatment for Complex Anionic Analytes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 136-142 (1997).
- 97) Martin, C. R.; Mitchell, D. T.: Nanomaterials in Analytical Chemistry. *Anal. Chem.* **70**, 322-327 (1998).
- 98) Cohen, S. L.; Chait, B. T.: Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins. *Anal. Chem.* **68**, 31-37 (1996).
- 99) Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M.: Direct Tissue Analysis Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Practical Aspects of Sample Preparation. *J. Mass Spectrom.* **38**, 699-708 (2003).

- 100) Kaufmann, R.; Hillenkamp, F.; Wechsung, R.: Laser Microprobe Mass Analyzer (LAMMA) – New Instrument for Biomedical Microprobe Analysis. *Med. Prog. Technol.* **6**, 109-121 (1979).
- 101) Rohner, T. C.; Staab, D.; Stoeckli, M.: MALDI Mass Spectrometric Imaging of Biological Tissue Sections. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 177-185 (2005).
- 102) Svatoš, A.: Mass Spectrometric Imaging of Small Molecules. *Trends in Biotechnology.* **28**, 425-434 (2010).
- 103) Cornett, D. S.; Reyzer, M. L.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M.: MALDI Imaging Mass Spectrometry: Molecular Snapshots of Biochemical Systems. *Nat. Methods.* **4**, 828-833 (2007).
- 104) Esquenazi, E.; Yang, Y. L.; Watrous, J.; Gerwick, W. H.; Dorrestein, P. C.: Imaging Mass Spectrometry of Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1521-1534 (2009).
- 105) McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. A.: Imaging Mass Spectrometry. *Mass Spectrom, Rev.* **26**, 606-643 (2007).
- 106) Kaletas, B. K.; Wiel, I. M.; Stauber, J.; Dekker, L. J.; Güzel, C.; Kros, J. M.; Luijck, T. M.; Heeren, R. M. A.: Sample Preparation Issues for Tissue Imaging by Imaging MS. *Proteomics.* **9**, 2622-2633 (2009).
- 107) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M.: Imaging Mass Spectrometry: Principles and Potentials. *J. Toxicol. Pathol.* **33**, 92-101 (2005).
- 108) Lee, Y. J.; Perdian, D. C.; Song, Z.; Yeung, E. S.; Nikolauz, B. J.: Use of Mass Spectrometry for Imaging Metabolites in Plants. *Plant J.* **70**, 81-95 (2012).

- 109) McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. A.: Imaging Mass Spectrometry. *Mass Spectrom, Rev.* **26**, 606-643 (2007).
- 110) Eberlin, L. S.; Ifa, D. R.; Wu, Ch.; Cooks, R. G.: Three-Dimensional Visualization of Mouse Brain by Lipid Analysis Using Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 873-876 (2010).
- 111) Korte, A. R.; Song, Z.; Nikolau, B. J.; Lee, Y. J.: Mass Spectrometric Imaging as a High-Spatial Resolution Tool for Functional Genomics: Tissue-Specific Gene Expression of *TT7* Inferred from Heterogeneous Distribution of Metabolites in *Arabidopsis* flowers. *Anal. Methods.* **4**, 474-481 (2012).
- 112) Shroff, R.; Vergara, F.; Muck, A.; Svatoš, A.; Gershenzon, J.: Nonuniform Distribution of Glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* Leaves Has Important Consequences for Plant Defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 6196-6201 (2008).
- 113) Gobom, J.; Schuerenberg, M.; Mueller, M.; Theiss, D.; Lehrach, H.; Nordhoff, E.: α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Affinity Sample Preparation. A Protocol for MALDI-MS Peptide Analysis in Proteomics. *Anal. Chem.* **73**, 434-438 (2001).
- 114) Chaurand, P.; Stoeckli, M.; Caprioli, R. M.: Direct Profiling of Proteins in Biological Tissue Sections by MALDI Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **71**, 5263-5270 (1999).
- 115) Bann, B.; Miller, S. A.: Melamine and Derivatives of Melamine. *Chem. Rev.* **58**, 131-172 (1958).
- 116) Newton, G. L.; Utley, P. R.: Melamine as a Dietary Nitrogen-Source for Ruminants. *J. Anim. Sci.* **47**, 1338-1344 (1978).

- 117) Brown, C. A.; Jeong, K. S.; Poppenga, R. H.; Puschner, B.; Miller, D. M.; Ellis, A. E.; Kang, K. I.; Sum, S.; Cistola, A. M.; Brown, S. A.: Outbreaks of Renal Failure Associated with Melamine and Cyanuric Acid in Dogs and Cats in 2004 and 2007. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19**, 525-531 (2007).
- 118) Chen, B.; Liu, X. Y.; Li, S. G.; Zhou, Y.; Jiang, Q. W.: Melamine Exposure Assessment in Children with Nephrolithiasis. *Pediatr. Nephrol.* **24**, 2065-2067 (2009).
- 119) Chan, E. Y.; Griffiths, S. M.; Chan, C. W.: Public-Health Risks of Melamine in Milk Products. *Lancet.* **372**, 1444-1445 (2008).
- 120) Sun, F. X.; Ma, W.; Xu, L. G.; Zhu, Y. Y.; Liu, L. Q.; Peng, C. F.; Wang, L. B.; Kuang, H.; Xu, C. L.: Analytical Methods and Recent Developments in the Detection of Melamine. *Trends Anal. Chem.* **29**, 1239-1249 (2010).
- 121) Andersen, W. C.; Turnipseed, S. B.; Karbiwnyk, C. M.; Clark, S. B.; Madson, M. R.; Gieseke, C. A.; Miller, R. A.; Rummel, N. G.; Reimschuessel, R.: Determination and Confirmation of Melamine Residues in Catfish, Trout, Tilapia, Salmon, and Shrimp by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 4340-4347 (2008).
- 122) Filigenzi, M. S.; Puschner, B.; Aston, L. S.; Poppenga, R. H.: Diagnostic Determination of Melamine and Related Compounds in Kidney Tissue by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7593-7599 (2008).
- 123) Yan, N.; Zhou, L.; Zhu, Z. F.; Chen, X. G.: Determination of Melamine in Dairy Products, Fish Feed, and Fish by Capillary Zone Electrophoresis with Diode Array Detection. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 807-811 (2009).

- 124) Wang, Q. A.; Haughey, S. A.; Sun, Y. M.; Eremin, S. A.; Li, Z. F.; Liu, H.; Xu, Z. L.; Shen, Y. D.; Lei, H. T.: Development of a Fluorescence Polarization Immunoassay for the Detection of Melamine in Milk and Milk Powder. *Anal Bioanal Chem.* **399**, 2275-2284 (2010).
- 125) Pietrzyk, A.; Kutner, W.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; D'Souza, F.; Sannicolo, F.; Mussini, P. R.: Melamine Acoustic Chemosensor Based on Molecularly Imprinted Polymer Film. *Anal. Chem.* **81**, 10061-10070 (2009).
- 126) Liu, F. Y.; Yang, X.; Sun, S. G.: Determination of Melamine Based on Electrochemiluminescence of Ru(bpy)(3)(2+) at Bare and Single-wall Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrodes. *Analyst.* **136**, 374-378 (2010).
- 127) Van Berkel, G. J.; Pasilis, S. P.; Ovchinnikova, O.: Established and Emerging Atmospheric Pressure Surface Sampling/Ionization Techniques for Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **43**, 1161-1180 (2008).
- 128) Dane, A. J.; Cody, R. B.: Selective Ionization of Melamine in Powdered Milk by Using Argon Direct Analysis in Real Time (DART) Mass Spectrometry. *Analyst.* **135**, 696-699 (2010).
- 129) Yang, S. P.; Ding, J. H.; Zheng, J.; Hu, B.; Li, J. Q.; Chen, H. W.; Zhou, Z. Q.; Qiao, X. L.: Detection of Melamine in Milk Products by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **81**, 2426-2436 (2009).
- 130) Zhu, L.; Gamez, G.; Chen, H. W.; Chingin, K.; Zenobi, R.: Rapid Detection of Melamine in Untreated Milk and Wheat Gluten by Ultrasound-Assisted Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry (EESI-MS). *Chem. Commun.* **5**, 559-561 (2009).

- 131) Hoath, S. B.; Narendran, V.; Visscher, M. O.: Role and Biology of Vernix. *Neonatal Infant Nurs. Rev.* **1**, 53-58 (2001).
- 132) Visscher, M. O.; Narendram, V.; Pickens, W. L.; LaRuffa, A. A.; Meinzen-Derr, J.; Allen, K.; Hoath, S. B.: Vernix Caseosa in Neonatal Adaptation. *J. Perinatol.* **25**, 440-446 (2005).
- 133) Rissmann, R.; Groenink, H. W.; Weerheim, A. M.; Hoath, S. B.; Ponc, M.; Bouwstra, J. A.: New Insights into Ultrastructure, Lipid Composition and Organization of Vernix Caseosa. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1823-1833 (2006).
- 134) Tollin, M.; Bergsson, G.; Kai-Larsen, Y.; Lengqvist, J.; Sjoval, J.; Griffiths, W.; Skuladottir, G. V.; Haraldsson, A.; Jornvall, H.; Gudmundsson, G. H.; Agerberth, B.: Vernix Caseosa as a Multi-Component Defence System Based on Polypeptides, Lipids and Their Interactions. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2390-2399 (2005).
- 135) De Luca, V.; St. Pierre, B.: The Cell and Developmental Biology of Alkaloids Biosynthesis. *Trends Plant Sci.* **5**, 168-173 (2000).
- 136) Bisset, N. G.: Arrow Poisons in China. Part II. *Aconitum* – Botany, Chemistry, and Pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **4**, 247-336 (1981).
- 137) Chan, T. Y. K.: Aconitine Poisoning: A Global Perspective. *Vet. Hum. Toxicol.* **36**, 326-328 (1994).
- 138) Chan, T. Y. K.; Tomlinson, B.; Tse, L. K. K.; Chan, J. C.; Chan, W. W.; Critchley, J. A.: Aconitine Poisoning due to Chinese Herbal Medicines: A Review. *Vet. Hum. Toxicol.* **36**, 452-455 (1994).
- 139) Dickens, P.; Tai, Y. T.; But, P. P.; Tomlinson, B.; Ng, H. K.; Yan, K. W.: Fatal Accidental Aconitine Poisoning Following Ingestion of Chinese Herbal Medicine: A Report of Two Cases. *Forensic Sci. Int.* **67**, 55-58 (1994).

- 140) Chan, T. Y.; Critchley, J.: The Spectrum of Poisonings in Hong Kong: An Overview. *Vet. Hum. Toxicol.* **36**, 135-137 (1994).
- 141) Sun, A.; Gao, B.; Ding, X.; Huang, C.-M.; But, P. P.-H.: Quantitative and Qualitative Analysis of Aconitum Alkaloids in Raw and Processed Chuanwu and Caowu by HPLC in Combination with Automated Analytical System and ESI/MS/MS. *J. Anal. Methods Chem.* **2012**, 1-7 (2012).
- 142) Zhang, F.; Tang, M. H.; Chen, L. J.; Li, R.; Wang, X. H.; Duan, J. G.; Zhao, X.; Wei, Y. Q.: Simultaneous Quantitation of Aconitine, Mesaconitine, Hypaconitine, Benzoylaconine, Benzoylmesaconine and Benzoylhypaconine in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Pharmacokinetics Evaluation of "SHEN-FU" Injectable Powder. *J. Chromatogr. B.* **873**, 173-179, 2008.
- 143) Ito, K.; Ohyama, Y.; Hishinuma, T.; Mizugaki, M.: Determination of *Aconitum* Alkaloids in the Tubers of *Aconitum japonicum* Using Gas Chromatography/Selected Ion Monitoring. *Planta Med.* **62**, 57-59 (1996).
- 144) Zhao, S.; Pan, Z.; Chen, X.; Hu, Z.: Analysis of the Aconitine Alkaloids in Traditional Chinese Medicines by Nonaqueous Capillary Electrophoresis Using a New Recording Mode. *Biomed. Chromatogr.* **18**, 381-387 (2004).
- 145) Howard, R. W.; Blomquist, G. J.: Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 371-393 (2005).
- 146) Nelson, D. R.; Blomquist, G. J.: Insect Waxes. In *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. Hamilton, R. J. (Ed.). The Oily Press: Dundee, Scotland, 1995, p. 1-90.
- 147) Brucker, J. S.: Cuticular Polar Lipids of Insects. In *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry & Biology*, Stanley-Samuelson, D. W.; Nelson, D. R. (Eds.). University of Nebraska Press: Lincoln, Nebraska, 1993, p. 227-270.

- 148) Scott, D.: Sexual Mimicry Regulates the Attractiveness of Mated *Drosophila melanogaster* Females. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 8429-8433 (1986).
- 149) Hall, J. C.: The Mating of a Fly. *Science*. **264**, 1702-1714 (1994).
- 150) Ferveur, J. F., Sureau, G.: Simultaneous Influence on Male Courtship of Stimulatory and Inhibitory Pheromones Produced by Live Sex-Mosaic *Drosophila melanogaster*. *Proc. Biol. Sci.* **263**, 967-973 (1996).
- 151) Antony, C.; Davis, T. L.; Carlson, D. A.; Pechine, J. M.; Jallon, J. M.: Compared Behavioral Responses of Male *Drosophila melanogaster* (Canton-S) to Natural and Synthetic Aphrodisiacs. *J. Chem. Ecol.* **11**, 1617-1629 (1985).
- 152) Butterworth, F. M.: Lipids of *Drosophila*: A Newly Detected Lipid in the Male. *Science*. **163**, 1356-1357 (1969).
- 153) Bartelt, R. J., Schaner, A. M., Jackson, L. L.: *cis*-Vaccenyl Acetate as an Aggregation Pheromone in *Drosophila melanogaster*. *J. Chem. Ecol.* **11**, 1747-1756 (1985).
- 154) Ejima, A.; Smith, B. P.; Lucas, C.; van der Goes van Naters, W.; Miller, C. J.; Carlson, J. R.; Levine, J. D.; Griffith, L. C.: Generalization of Courtship Learning in *Drosophila* is Mediated by *cis*-Vaccenyl Acetate. *Curr. Biol.* **17**, 599-605 (2007).
- 155) Yew, J. Y.; Dreisewerd, K.; Luftmann, H.; Müthing, J.; Pohlentz, G.; Kravitz, E. A.: A New Male Sex Pheromone and Novel Cuticular Cues for Chemical Communication in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **19**, 1245-1254 (2009).
- 156) Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G. H.: A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509 (1957).

- 157) Matyash, V.; Liebisch, G.; Kurzchalia, T. V.; Shevschenko, A.; Schwudke, D.: Lipid Extraction by Methyl-tert-Butyl Ether for High-Throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* **49**, 1137-1146 (2008).
- 158) Ranc, V.; Havlíček, V.; Bednář, P.; Lemr, K.: Nanoelectrospray Versus Electrospray in Chiral Analysis by the Kinetic Method. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **74**, 313-322 (2009).
- 159) Ranc, V.; Havlíček, V.; Bednář, P.; Lemr, K.: Nano-Desorption Electrospray and Kinetic Method in Chiral Analysis of Drugs in Whole Human Blood Samples. *Eur. J. Mass Spectrom.* **14**, 411-417 (2008).
- 160) Ifa, D. R.; Wiseman, J. M.; Song, Q. Y.; Cooks R. G.: Development of Capabilities for Imaging Mass Spectrometry Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization (DESI). *Int. J. Mass Spectrom.* **259**, 8-15 (2007).
- 161) Cvačka, J.; Svatoš, A.: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Analysis of Lipids and High Molecular Weight Hydrocarbons with Lithium 2,5-dihydroxybenzoate Matrix. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2203-2207 (2003).
- 162) Strohalm, M.; Strohalm, J.; Kaftan, F.; Krasny, L.; Volny, M.; Novak, P.; Ulbrich, K.; Havlíček, V.: Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-Based Tissue-Embedding Medium Compatible with MALDI Mass Spectrometry Imaging Experiments. *Anal. Chem.* **83**, 5458–5462 (2011).
- 163) Sun, A. M.; Li, H.; Huang, Z. M.; But, P. P.-H.; Ding, X. Q.: Analysis of the Aconitine in Chuanwu by Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry. *Chinese Chem. Lett.* **15**, 1071-1074 (2004).
- 164) Beike, J.; Frommherz, L.; Wood, M.; Brinkmann, B.; Köhler, H.: Determination of Aconitine in Body Fluids by LC-MS-MS. *Int. J. Legal Med.* **118**, 289-293 (2004).

- 165) Haddad, R.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N.: Easy Ambient Sonic Spray Ionization-Membrane Interface Mass Spectrometry for Direct Analysis of Solution Constituents. *Anal. Chem.* **80**, 898-903 (2008).
- 166) Haddad, R.; Milagre, H. M. S.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N.: Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry Combined with Thin-Layer Chromatography. *Anal. Chem.* **80**, 2744-2750 (2008).
- 167) Roach, P. J.; Laskin, J.; Laskin, A.: Nanospray Desorption Electrospray Ionization: An Ambient Method for Liquid-Extraction Surface Sampling in Mass Spectrometry. *Analyst.* **135**, 2233-2236 (2010).
- 168) Gao, L.; Li, G.; Cyriac, J.; Nie, Z.; Cooks, R.G.: Imaging of Surface Charge and the Mechanism of Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Phys. Chem. C.* **114**, 5331–5337 (2010).
- 169) Václavík, L.; Rosmus, J.; Popping, B.; Hajšlová, J.: Rapid Determination of Melamine and Cyanuric Acid in Milk Powder Using Direct Analysis in Real Time-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr A.* **1217**, 4204-4211 (2010).
- 170) Setz, P. D.; Knochenmuss, R.: Exciton Mobility and Trapping in a MALDI Matrix. *J. Phys. Chem. A.* **109**, 4030-4037 (2005).
- 171) Knochenmuss, R.: Photoionization Pathways and Free Electrons in UV-MALDI. *Anal. Chem.* **276**, 3179-3184 (2004).
- 172) Frankevich, V. F.; Zhang, J.; Friess, S. D.; Dashtiev, M.; Zenobi, R.: Role of Electrons in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 6063-6067 (2003).

- 173) Garrett, T. J.; Prieto-Conaway, M. C.; Kovtoun, V.; Bui, H.; Izgarian, N.; Stafford, G.; Yost, R. A.: Imaging of Small Molecules in Tissue Sections with a New Intermediate-Pressure MALDI Linear Ion Trap Mass Spectrometer. *Int. J. Mass.* **260**, 166-176 (2007).
- 174) Jallon, J. M.; Antony, C.; Benamar, O.: Un anti-aphrodisiaque produit par les males de *Drosophila melanogaster* et transferral aux femelles lors de la copulation. *C.R. Acad. Soil Paris* **292**, 1147-1149 (1981).
- 175) Yew, J. Y.; Soltwisch, J.; Pirkel, A.; Dreisewerd, K.: Direct Laser Desorption Ionization of Endogenous and Exogenous Compounds from Insect Cuticles: Practical and Methodologic Aspects. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 1273-1284 (2011).
- 176) Kawamoto, T.: Use of a New Adhesive Film for the Preparation of Multi-Purpose Fresh-Frozen Sections from Hard Tissues, Whole-Animals, Insects and Plants: *Arch. Histol. Cytol.* **66**, 123–143 (2003).
- 177) Kopeček, J.: Controlled Biodegradability of Polymers a Key to Drug Delivery Systems. *J. Biomaterials.* **5**, 19–25 (1984).
- 178) Kopeček, J.; Kopečková, P.: HEMA Copolymers: Origins, Early Developments, Present, and Future. *Adv. Drug Delivery Rev.* **62**, 122–149 (2010).

9. VÝTISKY PUBLIKACÍ

Scanning electron microscopic imaging of surface effects in desorption and nano-desorption electrospray ionization

Filip Kaftan,^{a,b} Olga Kofroňová,^c Oldřich Benada,^c Karel Lemr,^{c,d} Vladimír Havlíček,^{c,d} Josef Cvačka^a and Michael Volný^{c,*}

Scanning electron microscopy was used to investigate rivulets that are formed on the analyzed surface during desorption electrospray ionization (DESI) experiment. Ferromagnetic nanoparticles added to the spray solvent in a form of colloid solution functioned as an additional surface probe. The existence of the rivulets was confirmed on glass and newly demonstrated on two different types of porous polytetrafluoroethylene (PTFE). The results show that in standard DESI set-up the rivulets are arranged into very regular shapes. Same rivulets were obtained in DESI experiments without high voltage on the sprayer. However, no such rivulets or any other regular patterns were found on a surface in nano-DESI (nanospray DESI without the carrier nebulizing gas) experiments. This indicates that symmetrical rivulets are created by the hydrodynamical rather than electrostatic forces. It was also demonstrated that blocking the rivulets by a simple physical barrier did not influence known surface charging effects. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: ionization; DESI; nano-DESI; electron microscopy; mass spectrometry

Introduction

Ambient desorption ionization mass spectrometry (MS) allows for the direct analysis of surfaces and ordinary objects in the open atmosphere. Analyte desorption usually accompanies the ionization step and both processes are often multi-step processes.^[1] Since the independent introduction of desorption electrospray ionization (DESI)^[2] and direct analysis in real-time (DART),^[3] two ambient techniques that pioneered the field more than 20 other ambient approaches were introduced and several thorough reviews of the ambient MS field are now available.^[1,4–7]

The DESI mechanism was proposed in the Supporting Information of the original paper,^[2] and subsequent work from several research groups further contributed to its elucidation. Cooks group originally suggested three DESI mechanisms: chemical sputtering (based on charge transfer from gas-phase ion to the analyte on surface), neutral volatilization (based on positionization of volatile analytes desorbed from surface) and droplet pickup.^[8,9] While the first two mechanisms only apply in special cases, the droplet pickup mechanism is now considered to be the most common and universally accepted.^[10]

Numerical multiphase fluid dynamics simulations have been used to interrogate droplet-surface collision behavior and resultant progeny droplet formation on an ambient surface.^[11] It has been demonstrated that a momentum-transfer event on a wetted surface is sufficient to replicate known progeny droplet properties.^[11] Thus, the simulations confirmed the experimentally known formation of thin films of solvent on the surface, from which droplets of analyte are ejected into the air. These secondary droplets then undergo a standard ESI ionization mechanism.^[12] From the practical point of view, the major strength of the droplet pickup mechanism thus lies in the fact that it sufficiently explains

why DESI and standard ESI spectra are very similar, often even identical.

It is known that certain combinations of substrate, spray and analyte are highly favored for DESI analysis^[8,9] and the deeper details of the DESI processes have been studied from several perspectives to gain non-empirical understanding of the system. Characteristics of the spray both before and after surface impact have been investigated by phase Doppler anemometry (PDA).^[13] These experiments indicate average droplet sizes of 2–4 µm and velocities between 100 and 200 m/s at 2 mm from the spray source. After surface collisions, small fast droplets tend to emerge closer to the surface, whereas larger droplets are found at larger angles.^[13]

The model used in simulations discounted contribution from electrostatic forces, including external electric fields from the sprayer and the inlet capillary of the mass spectrometer.^[11,14] It was also shown experimentally that the desorption efficiency in

* Correspondence to: Michael Volný, Laboratory of Molecular Structure Characterization, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vítězská 1083, CZ-142 20 Prague, Czech Republic. E-mail: mvolny@gmail.com

a Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Flemingovo nám. 2, 16610 Prague 6, Czech Republic

b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 2030/8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

c Laboratory of Molecular Structure Characterization, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vítězská 1083, CZ-142 20 Prague, Czech Republic

d Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17 Listopadu 12, CZ-771 46 Olomouc, Czech Republic

DESI is independent from electrostatic forces.^[15] Electrical and electrochemical factors were only rarely investigated in DESI but it has been found that the DESI system acts as a DC capacitor and that this behavior is surface dependent.^[16] Hydrophobic surfaces exhibited long lasting, steady currents in the progeny droplets exiting the surface, whereas more hydrophilic surfaces, such as glass, exhibited shorter times. A strong correlation between surface wettability (contact angle) and equivalent capacitor behavior was observed.^[16] Possible redox transformations of the analyte in DESI were also investigated but the studies did not conclusively establish that the observed oxidation and reductions are due to high voltage supplied on the DESI sprayer or due to the surface charging.^[17,18] Limited electrochemical processes in DESI thus represent the biggest difference between DESI and ESI for the analysis of small singly charged ions. Recently, there have been three important DESI studies that all used rhodamine B on glass as model samples. The first one^[19] is an optimization study that identified the most important DESI parameters, investigated the analyte uptake and reached improved reproducibility of a DESI experiment. The second study^[20] used fluorescence measurements for on-line monitoring of surface processes during DESI and concluded that ions were also being produced using processes other than impact of the spray on the surface; that the ions were being produced at the ends of rivulets streaming away from the central impact region. The third study^[21] investigated distributions of charge deposited on surfaces in DESI using a static charge measurement apparatus and for the first time mapped the charge density on the surface.

In the present work, we employed two tools to look at the surface processes in DESI. One is the standard scanning electron microscopy (SEM), which provides better surface resolution than previously used optical and fluorescence imaging. The second is the utilization of ferromagnetic nanoparticles that were added in the form of colloid solution to the primary spray and used as a surface tracer; it was demonstrated that it is possible to use colloid nanoparticles as a primary DESI spray, deliver them on the sample surface being analyzed and examine this surface under the conditions of a continuous and stable spray. Results for three different DESI arrangements are compared and discussed. Because SEM imaging of surfaces requires specific conditions, including vacuum environment, no on-line SEM measurements can be directly coupled to DESI. Thus, the observed surface features discussed in this work are air-dried, static remains of the rivulets, and not the dynamic rivulets itself. However, the off-line findings are in agreement with the previous 'rivulet' studies^[20,22] and more thorough insight is presented.

Experimental

Chemicals and materials

Surfaces

Two different porous polytetrafluoroethylene (PTFE) surfaces were used in this study. Porous PTFE I was obtained from Fluoro-Plastics, Inc. (USA, # P51/8X12A) and porous PTFE II from Small Parts, Inc. (USA, #PPTS-06 030). Glass slides were standard microscopy slides (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs, GmbH, Germany). Rhodamine B was sampled simply by making regular lines with a red pen from Sharpie (USA, SEM images show that this simple technique gives sufficiently uniform coating of rhodamine B). The use of rhodamine as a convenient ambient desorption

ionization standard was first demonstrated by Ila *et al.*^[23] and it was previously reported that the red Sharpie contains rhodamine B.^[22,24]

Solvents

Methanol (supra-gradient HPLC grade) was purchased from Scharlab S.L. (Spain). Acetic acid (99.99%+ grade, glacial) was purchased from Sigma-Aldrich and water (Milli-Q grade) was purified using Milli-Q instrument.

Nanoparticles

The composition of ferromagnetic nanoparticles was Fe₃O₄ and the size distribution was 35 ± 4 nm. They were obtained locally at the Academy of Sciences of the Czech Republic and were prepared by microemulsion method at the temperature 600 °C as described elsewhere.^[25] The colloid solution was prepared by adding 1 mg of the dry nanoparticles into 2 ml of methanol. The mixture was then sonicated for 5 min, decanted for 5 min and centrifuged (at 10 000 rcf for 3 min) to remove nanoparticles that aggregated during sonication. The remaining clear colloid solution was used directly as a primary DESI spray mixture.

SEM and gold coating

Air-dried samples on glass or PTFE slides were sputter-coated with gold in a Polaron E5100 sputter-coater (Quorum Technologies Ltd, UK). The gold layer thickness was estimated to 30 nm using formula given in the device manual. The samples were analyzed in an Aquasem scanning electron microscope (Tescan, Czech Republic) at 15 kV using secondary electron detector. Representative images were taken at primary magnifications of 80×, 150×, 500×, 1000× and 1500× for each sample.

Mass spectrometry

The DESI spectra were recorded using an LCQ Fleet ion-trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA) equipped with an in-house built DESI source. The ion source consisted of a manually operated xyz stage with MX10R micromanipulator (Siskiyou Corporation, USA) and a sprayer built from 100 µm ID fused silica capillary (400 µm OD). The capillary was inserted into a 1/16 in. PEEK Tee for OD tubing (Upchurch Scientific, USA) with a piece of a stainless steel 1/16 in. OD capillary (57 mm, 500 µm ID) mounted in it. The nebulizing gas was delivered from the side port using a 1/16 in. OD PTFE tubing. The sprayer was connected to a syringe pump (Harvard Pump 11 Plus, Harvard Apparatus, USA). The high voltage for spraying the mobile phase was applied using an alligator clip attached to the syringe metal needle. The nebulizing gas (N₂, 60–80 arbitrary units) as well as high voltage for the spraying was supplied by the LCQ instrument and controlled by Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific). The DESI source was operated at 5.0–5.5 kV, the capillary temperature was 200 °C, and the capillary and tube lens voltages were 10 and 75 V. The mobile phase (methanol; flow rate 8 µl/min) was sprayed under the angle of 50° against the surface; the collection angle was approximately 10–15°. The EASI (DeSSI)^[20,26–28] set-up was obtained just by setting the spray voltage to 0 V. The nano-DESI set-up was identical with the one described in the literature.^[29,30]

Safety consideration

The high voltage applied to the DESI is potentially hazardous. Care should be taken to use a high-voltage supply with limited current capacity and to insulate the high-voltage cable and connection to the DESI source or syringe needle. Colloid nanoparticles solvated in methanol are not likely to represent any human health-related risk if all general safety rules compulsory for chemical laboratory are applied and followed. However, we considered a possibility that nanoparticles could contaminate the mass spectrometer. From our observations, major fraction of nanoparticles remained on the surface and did not enter the mass spectrometer. The nanoparticles that reached the instrument were collected mostly inside the inlet capillary or, in minimal quantity, on the first skimmer and they could be treated and cleaned as normal contamination (e.g. buffers). However, we did not perform the experiments on other instruments with different atmospheric pressure inlets.

Results and Discussion

Figure 1 shows SEM images of impact sites on glass with predeposited rhodamine B as a model analyte (100% methanol was used as a spray mixture). All SEM measurements were performed off-line after 60 s of spray impact and the analyte was completely removed from the central area of the spot due to DESI spraying. The immediately noticeable feature in Fig. 1 (Panel A) is the existence

of rivulets formed by removed analyte that are flowing from the center impact spot. Their existence was first described by fluorescence detection^[20] but the better resolution of SEM shows additional features. Interestingly, the rivulets arrange into a 'comet-like' shape around the central spot with a 'tail' oriented towards the inlet of mass spectrometer (spray direction). The details of impact spot (Fig. 1, Panels B and C) show that the rivulets are not straight but bent. This effect is especially visible on the bottom of the impact spot (Fig. 1, Panel C) where the rivulets undergo a significant change of its original direction and turn back into the macroscopic spray direction.

Similar effects exist on PTFE surfaces (Fig. 2), although the rivulets are less visible than on glass due to the topographical features on porous PTFE surfaces that reduce imaging contrast in SEM. The SEM images of rivulets details on PTFE II taken at different magnifications are included as the Supporting Information (Fig. S1).

To investigate if the effects only apply to standard spray with pure solvents or if it has a more general manifestation, ferromagnetic nanoparticles in the form of colloid solution were added to the primary spray solvent (methanol). It is well known that during DESI experiment the size of the droplets is being effectively reduced due to the evaporation, consecutive coulombic explosions and finally due to the collision with the surface. Colloid nanoparticles, on the other hand, are likely to exhibit opposite behavior because they aggregate and become bigger during

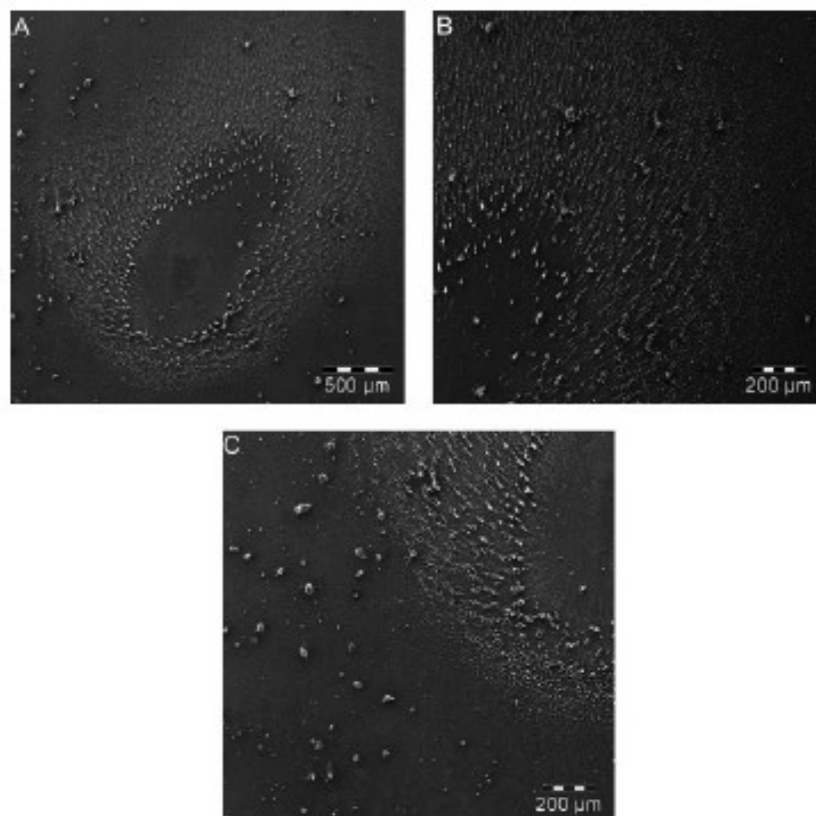


Figure 1. SEM images of rhodamine B removed from glass surface by DESI spray. Panel A: overall spot; Panel B: details of the upper part of the impact spot (closer to the MS inlet); Panel C: details of the bottom part of the impact spot.

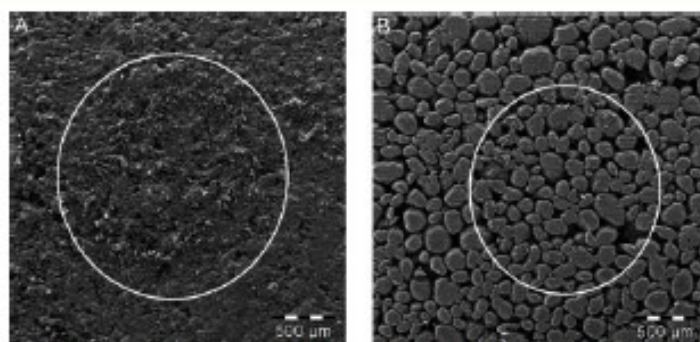


Figure 2. SEM images of rhodamine B removed from PTFE surfaces by DESI spray. Panel A: PTFE I; Panel B: PTFE II. The white ovals identify the impact area. The boundaries of the impact spots are inside the oval and are concentric with it. More detailed images of PTFE II surface are included as the Supporting Information.

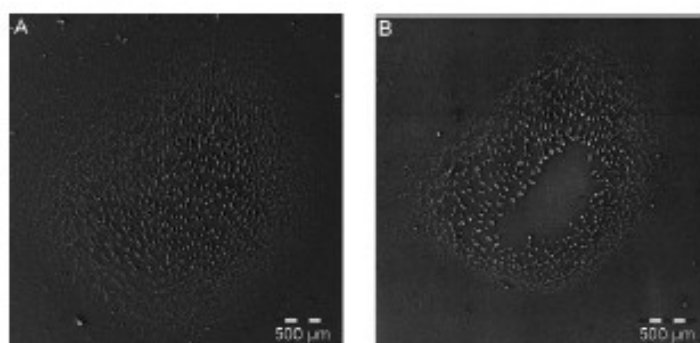


Figure 3. SEM images of rhodamine B removed from glass surface by DESI spray with ferromagnetic nanoparticles. Panel A: with magnet under the glass surface; Panel B: without the magnet.

the DESI experiment. The ferromagnetic nanoparticles can be manipulated on glass surface by a common magnet from the other side of the glass slide and the experiments were performed in two different arrangements: with and without magnet positioned under the glass surface during spraying. Figure 3 shows the glass surface with rhodamine B removed during DESI spraying with colloid nanoparticles. It can be seen that nanoparticles stay on the surface and if the arrangement with magnet below the glass slide is used (Panel A) they can be found even in the primary impact zone of the spray. In both the arrangements (Panels A and B), the distribution of nanoparticles on the surface shows the regularity of rivulets. Because the aggregated nanoparticles are bigger (their size was estimated by SEM to be on the order of tens of micrometers) than terminal DESI droplets or solvated ions, it seems that the final shape of the rivulets is not critically mass dependent.

To evaluate the influence of the external electrostatic fields on the formation of rivulets, we performed the same experiments with the identical DESI set-up but without the high voltage on the sprayer (this experimental arrangement is sometimes referred to as easy ambient sonic spray ionization, EASI^[26,28] or desorption sonic spray ionization, DeSSI^[27]) and in a nano-DESI (also referred to as desorption nano-electrospray) arrangement,^[29–31] which uses nanospray capillary and high voltage but no nitrogen carrier gas. Figure 4 shows that the rivulets formed by DESI without high voltage on the sprayer (EASI) are also well arranged into the same bent shapes as with the high voltage present (Fig. 4, Panels A

and B). Thus, the absence of the external electric field has no impact on the rivulets. On the contrary, nano-DESI set-up creates no detectable rivulets on the surface although the SEM imaging shows the removal of the material from the impact region (Fig. 4, Panels C and D). These experiments indicate that the existence of rivulets is not influenced by the external electrostatic forces but rather by the hydrodynamic forces that exist due to the presence of nitrogen carrier gas. A reasonable explanation of the bent shape of the rivulets is that besides the main axial direction (the direction of the nitrogen flow) the droplets in DESI also have velocity in the radial direction, which is non-uniformly distributed. The radial velocity increases from the central impact region, but the component of the force in the direction of the flow is greater and therefore the particles on the surface will bend into the direction of the main flow. Gao *et al.*^[21] described the electrostatic potential lines on the surface due to surface charging but their influence on rivulets is none or not detectable by our experiments because under our experimental conditions, no difference was observed in rivulets bending between experiments with and without the external high voltage. Aggregated nanoparticles seem to follow the rivulets even in the presence of the external electric and magnetic fields. Supporting Information (Fig. S2) includes detailed scans of the aggregated nanoparticles on the surface that are arranged according to the rivulets. Their size on the surface can be estimated to be on the order of tens of microns (Fig. S2, Panel B). Nano-DESI has no nitrogen flow but for very small droplets the electrostatic contribution to their motion is sufficient. According

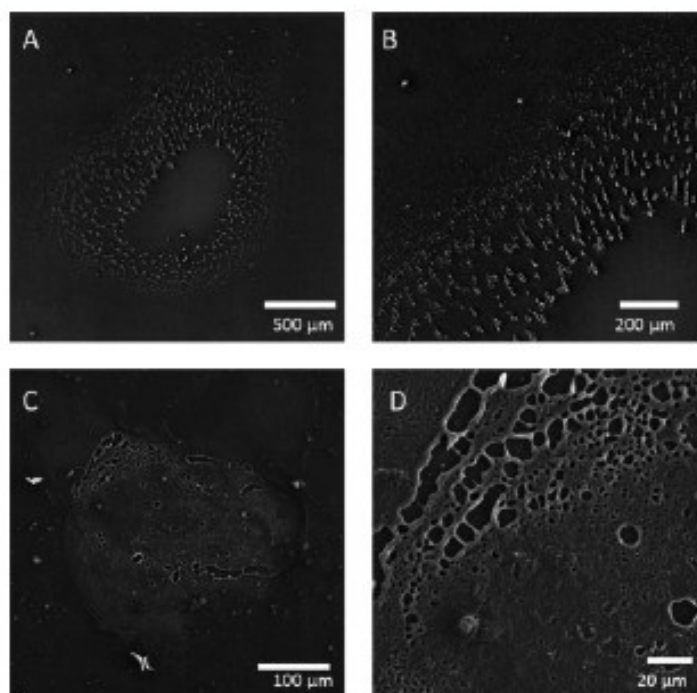


Figure 4. SEM images of rhodamine B removed from glass surface by EASI with ferromagnetic nanoparticles (Panel A: overview; Panel B: detailed) and by nano-DESI (Panel C: overview; Panel D: detailed).

to the images in Fig. 3 (Panels C and D) this velocity is sufficient for delivering the droplets to the surface but not for creating the rivulets. The image shows that the material is being dissolved and removed from the surface due to the impact but the area on the surface that interacts with the droplets is significantly smaller in nano-DESI than in standard DESI. Because both techniques provide practically the same mass spectra (with an exception of some differences in sample matrix tolerance^[29]), it seems that rivulets have no or negligible influence on desorption-ionization process and that the standard droplet pick up mechanism applies in both cases. The lower amount of removed analyte in nano-DESI is likely compensated by the known higher ionization efficiency of nanospray.^[32,33]

We also tested if blocking the rivulets (together with the secondary reflected droplets) by a physical barrier has any impact on surface charging, which was previously described in the standard DESI.^[16] A microscope glass was periodically inserted between the impact region and the mass spectrometer inlet during a DESI experiment (similar set-up was described in the literature^[20]) so the rivulets were discontinued by the glass. As expected this resulted in periodic decrease and increase of the signal measured by the ion trap. The pulses in the measured ion current had rectangular shapes; no nonlinear capacitance effects were observed (Fig. S3, Panel B). This is in contrast with an experiment where the periodic oscillation of the analytical signal is achieved by switching the high voltage on/off as described in the literature^[16] and reproduced in this work (Fig. S3, Panel A, where the capacitance effects are clearly detectable). Physical blocking of the rivulets, without suspending the high voltage on the sprayer, created no capacitance effects and the only result was that the analyte was blocked from entering the mass spectrometer.

This indicates that charging of the surface is independent on the removal of droplets from the impact region by the rivulets and thus that the surface charging is only influenced by the impact of the primary droplets. There are no capacitance effects measurable in EASI due to the lack of external high voltage on the sprayer.

The results of the presented study show that although DESI, EASI and nano-DESI experiments are accompanied by complex surface phenomena, which can be different for each of the three techniques, these differences do not have a significant impact on the main analytical usage of the techniques. This shows that the mainstream droplet pickup mechanism is very robust and functions independently of parallel surface processes.

Conclusion

This DESI/SEM study demonstrates that at least some portion of the droplets, which impact the surface in DESI experiment, travels and forms rivulets that stream from the center of the impact spot. This behavior is similar on glass and PTFE surfaces. Same rivulets are formed with high voltage (DESI) or without high voltage (EASI) on the sprayer. However, no rivulets were observed in nano-DESI, where no carrier gas is used while the high voltage is present. This indicates that the formation of bent rivulets is not dependent on external electrostatic forces but solely on hydrodynamic forces and that the shapes of the rivulets are due to the original velocities that droplets obtained from the carrier gas. Periodic blocking of the rivulets (and the secondary DESI droplets) by a physical barrier results in expected periodic decrease of the analytical signal but has no impact on surface charging/discharging cycles (while the periodic switching of the high voltage has).

Acknowledgements

The work was supported by the Czech Science Foundation (Project P206/10/P018) and by the Grant Agency of the Charles University in Prague (Project 162910). M.V.'s research was supported by a Marie Curie International Reintegration Grant within the 7th European Community Framework Program. Other support was provided by the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (LC545, ME10013) and by an institutional research concept of the Institute of Microbiology (AV0Z50200510) and of the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry (Z40550506), Academy of Sciences of the Czech Republic.

Supporting information

Supporting information may be found in the online version of this article.

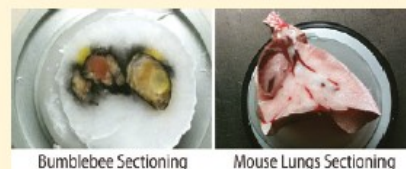
References

- [1] A. Venter, M. Nefliu, R. G. Cooks. Ambient desorption ionization mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 284.
- [2] Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan, R. G. Cooks. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* **2004**, *306*, 471.
- [3] R. B. Cody, J. A. Laramée, H. D. Durst. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2297.
- [4] D. J. Weston. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst* **2010**, *135*, 661.
- [5] G. J. Van Berkel, S. P. Pasilis, O. Ovchinnikova. Established and emerging atmospheric pressure surface sampling/ionization techniques for mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1161.
- [6] D. R. Ifa, C. P. Wu, Z. Ouyang, R. G. Cooks. Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview. *Analyst* **2010**, *135*, 669.
- [7] G. A. Harris, L. Nyadong, F. M. Fernandez. Recent developments in ambient ionization techniques for analytical mass spectrometry. *Analyst* **2008**, *133*, 1297.
- [8] Z. Takats, I. Cotte-Rodriguez, N. Talaty, H. W. Chen, R. G. Cooks. Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem. Commun.* **2005**, 1950.
- [9] Z. Takats, J. M. Wiseman, R. G. Cooks. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 1261.
- [10] B. Qiu, H. Luo. Desorption electrospray ionization mass spectrometry of DNA nucleobases: implications for a liquid film model. *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44*, 772.
- [11] A. B. Costa, R. G. Cooks. Simulated splashes: elucidating the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *464*, 1.
- [12] R. B. Cole. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, 2nd ed. Wiley: Hoboken, New Jersey, **2010**.
- [13] A. Venter, P. E. Sojka, R. G. Cooks. Droplet dynamics and ionization mechanisms in desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8549.
- [14] A. B. Costa, R. G. Cooks. Simulation of atmospheric transport and droplet-thin film collisions in desorption electrospray ionization. *Chem. Commun.* **2007**, 3915.
- [15] A. R. Venter, A. Kamali, S. Jain, S. Bairu. Surface sampling by spray-desorption followed by collection for chemical analysis. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1674.
- [16] M. Volny, A. Venter, S. A. Smith, M. Pazzi, R. G. Cooks. Surface effects and electrochemical cell capacitance in desorption electrospray ionization. *Analyst* **2008**, *133*, 525.
- [17] S. P. Pasilis, V. Kertesz, G. J. Van Berkel. Unexpected analyte oxidation during desorption electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1208.
- [18] M. Benassi, C. P. Wu, M. Nefliu, D. R. Ifa, M. Volny, R. G. Cooks. Redox transformations in desorption electrospray ionization. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, *280*, 235.
- [19] F. M. Green, P. Stokes, C. Hopley, M. P. Seah, I. S. Gilmore, G. O'Connor. Developing repeatable measurements for reliable analysis of molecules at surfaces using desorption electrospray ionization. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2286.
- [20] M. C. Wood, D. K. Busby, P. B. Farnsworth. Microscopic imaging of glass surfaces under the effects of desorption electrospray ionization. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6407.
- [21] L. Gao, G. T. Li, J. Cyriac, Z. X. Nie, R. G. Cooks. Imaging of surface charge and the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 5331.
- [22] V. Kertesz, G. J. van Berkel. Scanning and surface alignment considerations in chemical imaging with desorption electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1027.
- [23] D. R. Ifa, J. M. Wiseman, Q. Y. Song, R. G. Cooks. Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *259*, 8.
- [24] K. A. Meyer, O. Ovchinnikova, K. Ng, D. E. Goeringer. Development of a scanning surface probe for nanoscale tip-enhanced desorption/ablation. *Rev. Sci. Instrum.* **2008**, *79*, 123710.
- [25] P. Holec, J. Plocek, D. Niznansky, J. P. Vejpravova, in *5th International Conference on Sol-Gel Materials, Research, Technology, Applications*, Vol. 51, Trzebiezowice, Poland, **2008**, pp. 301.
- [26] R. Haddad, R. Sparrapan, T. Kotiaho, M. N. Eberlin. Easy ambient sonic-spray ionization-membrane interface mass spectrometry for direct analysis of solution constituents. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 898.
- [27] R. Haddad, R. Sparrapan, M. N. Eberlin. Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2901.
- [28] R. Haddad, H. M. S. Milagre, R. R. Catharino, M. N. Eberlin. Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2744.
- [29] V. Ranc, V. Havlicek, P. Bednar, K. Lemr. Nanoelectrospray versus electrospray in chiral analysis by the kinetic method. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2009**, *74*, 313.
- [30] V. Ranc, V. Havlicek, P. Bednar, K. Lemr. Nano-desorption electrospray and kinetic method in chiral analysis of drugs in whole human blood samples. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2008**, *14*, 411.
- [31] L. Hartmanova, V. Ranc, B. Papouskova, P. Bednar, V. Havlicek, K. Lemr. Fast profiling of anthocyanins in wine by desorption nano-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 4223.
- [32] M. R. Emmett, R. M. Caprioli. Micro-electrospray mass spectrometry—ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 605.
- [33] M. Wilm, M. Mann. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1.

Poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-Based Tissue-Embedding Medium Compatible with MALDI Mass Spectrometry Imaging ExperimentsMartin Strohalm,^{*,†} Jiří Strohalm,[‡] Filip Kaftan,^{§,⊥} Lukáš Krásný,^{†,¶} Michael Volný,[‡] Petr Novák,[‡] Karel Ulbrich,[‡] and Vladimír Havlíček[†][†]Institute of Microbiology AS CR, v.v.i., Prague, Czech Republic[‡]Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i., Prague, Czech Republic[§]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i., Prague, Czech Republic[⊥]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic[¶]Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic

S Supporting Information

ABSTRACT: Traditional tissue-sectioning techniques for histological samples utilize various embedding media to stabilize the tissue on a sectioning target and to provide a smooth cutting surface. Due to the ion suppression effect in MALDI ionization and number of background peaks in the low-mass region, these media are not suitable for mass spectrometry imaging (MSI) experiments. To overcome this, droplets of water are often used to mount the tissue on a sectioning target, but the ice block formed around the tissue does not provide a good support for sectioning of fragile samples. In this work, we propose a novel embedding media, compatible with MALDI ionization and MSI experiments, based on poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] (pHPMA). Using a reversible addition–fragmentation chain transfer polymerization technique, well-defined pHPMA polymer with narrow mass distribution was prepared. Benefits of the resulted pHPMA-based embedding media were tested on different tissue samples.



Mass spectrometry imaging technique (MSI) is an analytical tool capable of visualization of molecular distributions across the sample surface without the need for any chemical labeling. This technique gained much attention and popularity in recent years and has been applied to molecular histology of various tissue samples, plants, whole body sections, bacterial films, and many others. Readers interested in this topic may be referred to several reviews covering appropriate instrumentation, different parts of sample preparation, and analysis of acquired data.^{1–6} Although many aspects of traditional histological sample preparation can be directly transferred to MSI experiments, there are still important limitations.

Reliability of the information acquired from both histological and MSI experiments essentially depends on a quality of tissue sections. Direct freeze-sectioning is generally applicable on small soft tissues, but special handling may be required for hard or fragile samples.⁷ Various embedding media, such as optimal cutting temperature (OCT) compound not only are used to stabilize the tissue on a sectioning target but also provide a smooth cutting surface and preserve the fine tissue structure, which can be damaged by sectioning. For MSI experiments, however, the use of OCT-like media is not recommended.⁸ Common embedding media typically contain polyethylene glycol (PEG), polyvinyl alcohol (PVA), or both, which may pose serious problems in mass spectra acquisition and interpretation. Although a strong ion suppression effect is significant especially in the high-mass region, low-molecular-weight ion clusters of either PEG or PVA complicates data analysis in the low-mass region. In many cases,

a droplet of water can easily substitute for common embedding media to mount a tissue sample on a sectioning target. However, the ice block formed around the tissue does not provide a good support for sectioning of fragile samples, which can be easily damaged. Several techniques have been proposed to overcome this limitation by either substituting OCT with other media, using adhesive tapes, or using a combination of both. An aqueous solution of gelatin (100 mg/mL) has been used to retain overall sample shape for crustacean brain sections,^{9,10} and adhesive tapes (sometimes in combination with 2% aqueous solution of carboxymethylcellulose) has been used for whole-body sections of rats and mice.^{11,12} Similar technique have also been used for *Oryza sativa* rice sectioning.¹³

In this work, we propose a novel tissue-embedding medium based on the neutral and hydrophilic polymer poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] (pHPMA).¹⁴ This polymer was previously known for its excellent biocompatibility and nonimmunogenic properties and is currently employed in many drug-delivery studies.¹⁵

■ MATERIALS AND METHODS

Materials. The water-soluble initiator 4,4'-azobis(4-cyanopentanoic acid) and chain transfer agent 4-cyanopentanoic acid

Received: May 6, 2011

Accepted: June 2, 2011

Published: June 02, 2011

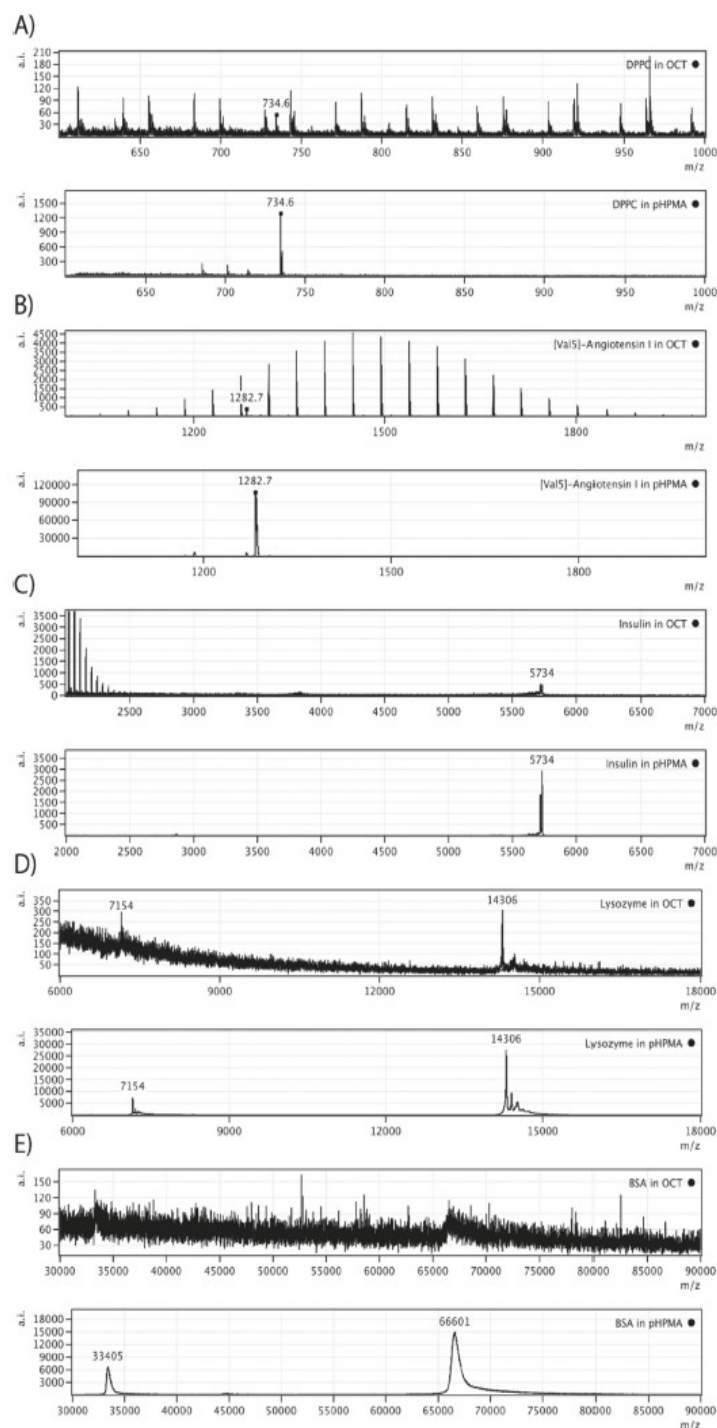


Figure 1. MALDI-TOF mass spectra of (A) DPPC, (B) [Val5] angiotensin I, (C) insulin, (D) lysozyme, and (E) BSA in the presence of either OCT or pHPMA. For each pair of the spectra, the same laser intensity and number of shots were retained.

dithiobenzoate, methacryloyl chloride, 1-amino-2-propanol, synthetic [Val5]-angiotensin I, bovine insulin, hen egg white lysozyme,

bovine serum albumin (BSA), immunoglobulin G (IgG) and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma-Aldrich,

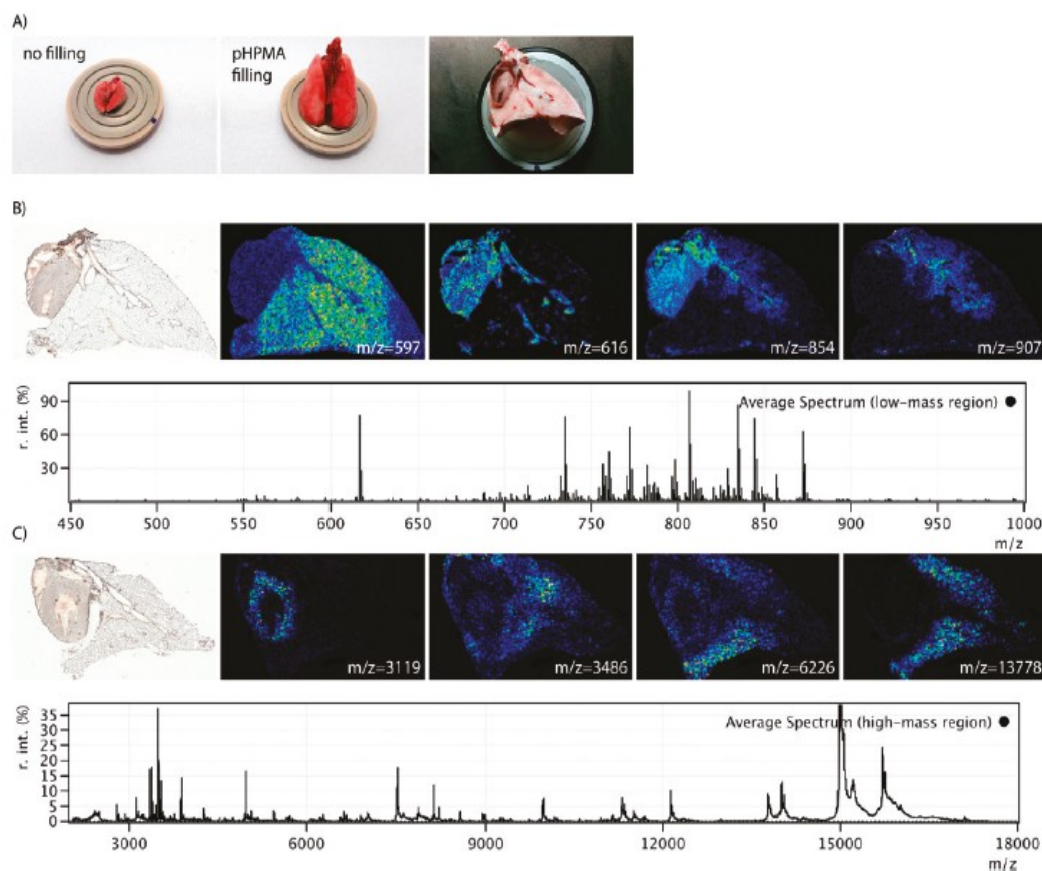


Figure 2. MSI of mouse lungs sample: (A) comparison of the native lungs without any filling and the lungs filled with pHPMA solution, (B) selected MSI images and average mass spectrum from the low-mass region acquired on FTICR, (C) selected MSI images and average mass spectrum from the high-mass region acquired on TOF.

Czech Republic; Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) was purchased from AvantiLipids, USA; Tissue-Tek embedding medium (OCT) was purchased from Sakura Finetek, Netherlands; α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapinic acid (SA), and indium–tin oxide glass slides (ITO) were purchased from Bruker Daltonics, Germany; ethanol and acetonitrile were purchased from Merck, Germany; water was purchased from J. T. Baker, USA.

Embedding Media Preparation. *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) was synthesized via a modified reaction of methacryloyl chloride with 1-aminopropan-2-ol in dichloromethane in the presence of sodium carbonate, as described by Ulbrich et al.¹⁶ Poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] was synthesized utilizing reversible addition–fragmentation chain transfer polymerization as described by Scales et al.¹⁷ Detailed description of polymer synthesis is also available in the Supporting Information. The resulting polymer was purified by ultrafiltration using an ultrafiltration membrane (MWCO 50000), lyophilized, and characterized by aqueous size-exclusion chromatography (M_w 145 000, M_w/M_n = 1.05). A 15% (w/w) solution of pHPMA powder in water was used as the proposed embedding medium for sample preparations.

Mouse Lungs Sample Preparation. After opening the abdominal cavity of the mouse body, the lungs and trachea were uncovered. Approximately 2 mL of pHPMA solution was introduced into the

lungs through the trachea using a syringe. To prevent draining of the pHPMA solution, the trachea was clamped by forceps before cutting and removing the lungs. Whole lungs (heart included) were fresh-frozen in liquid nitrogen using an aluminum container to prevent direct contact of the tissue and nitrogen.

Bumblebee Sample Preparation. A whole body of a bumblebee (*Bombus terrestris*) was placed into a microvial filled with the pHPMA solution. A vacuum desiccator was used to remove air bubbles from the body surface and to fill the inner air sacs with the embedding medium. Extreme caution and very gentle vacuum were applied to minimize possible tissue damage. The sample was fresh-frozen using liquid nitrogen.

MALDI Imaging Sample Preparation. Both samples were sectioned into 12 μ m thin slices using a cryomicrotome (CM1950, Leica, Germany) at -12°C . Slices were cut onto ITO glass slides and vacuum-dried in a desiccator for 30 min. For the high-mass region experiments, samples were gradually washed in 70% and 90% ethanol for 30 s each before matrix deposition. Two different matrices were used: CHCA (7 mg/mL in 50% acetonitrile, 0.2% TFA) for the low-mass region and SA (10 mg/mL in 60% acetonitrile, 0.2% TFA) for the high-mass region measurements. Matrices were applied by an ImagePrep (Bruker Daltonics, Germany) matrix deposition device using default methods.

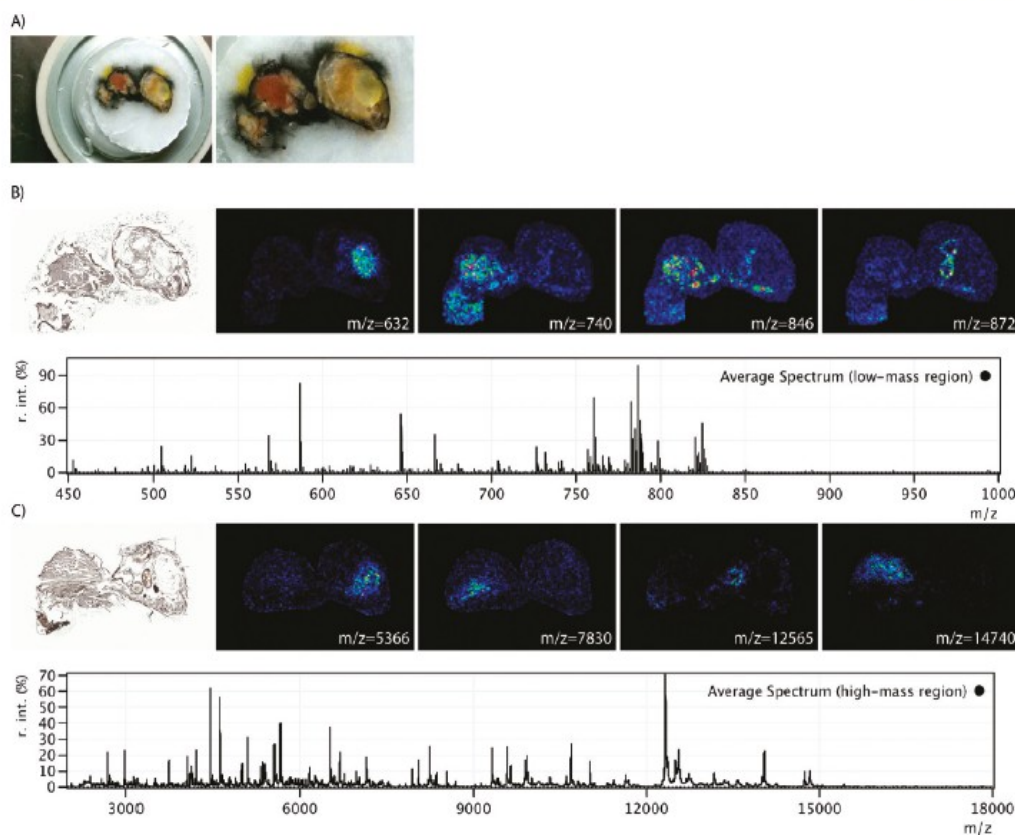


Figure 3. MSI of a bumblebee body sample: (A) bumblebee body embedded in a frozen pHPMA block, (B) selected MSI images and average mass spectrum from the low-mass region acquired on FTICR, (C) selected MSI images and average mass spectrum from the high-mass region acquired on TOF.

Mass Spectrometry. All single-spectrum experiments were performed on a MALDI-TOF/TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics, Germany) mass spectrometer equipped with a SmartBeam UV laser. For each sample, summed signal from 5000 subsequent scans from different positions throughout the sample spot were acquired and further analyzed by mMass software.¹⁸ MSI experiments in the high-mass region were performed on the same instrument with the 150 μm spatial resolution, acquiring 300 laser shots per position. MSI experiments in the low-mass region were performed using an APEX Ultra 9.4T FTICR MS (Bruker Daltonics, Germany) equipped with an Apollo II ESI/MALDI dual ion source. The spatial resolution was set to 150 μm , acquiring 400 laser shots per position. MSI data were subsequently processed and analyzed by FlexImaging software (Bruker Daltonics, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

Ion Suppression Effect and Background Peaks. Different compounds varying from 734 to 66 kDa of molecular mass were measured in the presence of either pHPMA solution or 50% (w/w) OCT solution in water. The final concentration of the analyte in solution was 0.1 mg/mL. The drawbacks of embedding media containing PEG and/or PVA are illustrated in Figure 1. In the low-mass region (Figure 1A–C), both the ion suppression effect and the strong background peak clusters are evident for the OCT. In the

case of pHPMA, however, no background peaks are visible, and more intense peaks were acquired (1–2 orders of magnitude). In the high-mass region (Figure 1D and E), background peaks do not pose any problem for the OCT, but the ion suppression effect is even more significant. Mass spectra of 150 kDa IgG were also acquired in the presence of pHPMA; surprisingly, no polymer signals were detected (Figure S-2 of the Supporting Information). Moreover, we were unable to detect any pHPMA signals in 15% pHPMA solution (without addition of other analyte) using SA as the matrix. This proof-of-principle experiment clearly demonstrates different characteristics and MALDI mass spectrometry capabilities of OCT and pHPMA embedding media.

MSI of mouse lungs sample. Applicability of pHPMA solution as an embedding medium for the MSI experiments was tested on a mouse lung tissue sample. Whole lungs were filled with pHPMA solution to retain its native structure and to provide a good support for sectioning (Figure 2A). While the structure of the lungs with no filling collapsed and no suitable slices could be prepared, the pHPMA-filled sample retained its native structure and provided compact tissue slices. MSI data were successfully acquired in a wide mass range and with no polymer-related background peaks detected (Figure 2B, C).

MSI of Bumblebee Body Sample. An insect body was selected as another example of a fragile sample, which is very hard (if not impossible) to slice without the appropriate support

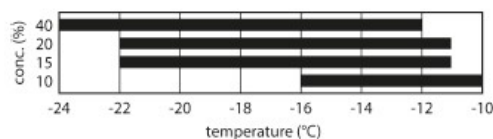


Figure 4. Applicable cutting temperatures for various concentrations of pHPMA in solution.

of any embedding media. Similarly to the lungs tissue, insect bodies contain inner compartments filled with air, causing the slices to collapse. Using a gentle vacuum, such compartments were filled with pHPMA solution. In contrast to the lung tissue, the whole insect body was additionally embedded into a pHPMA block to prevent splitting of different parts of the body (Figure 3A). MSI data were successfully acquired, showing a typical cluster of lipids in the low-mass (Figure 3B) region and small proteins in the high-mass region (Figure 3C). As for the previous sample, no polymer-related background peaks were observed.

pHPMA concentration. For both samples, a 15% solution of pHPMA was used, particularly because of its low viscosity, which was necessary to fill all the inner air compartments of those samples. However, various viscosities can be reached by changing the concentration of pHPMA from 10% up to 40%. An applicable cutting temperature was also slightly affected by the concentration of pHPMA (Figure 4). In general, the higher the concentration was, the lower the temperature that could be used for sectioning. On the other hand, for temperatures above -10°C , thin slices tend to roll up with increasing concentration of pHPMA.

CONCLUSION

In this study, a novel tissue-embedding medium compatible with MALDI mass spectrometry imaging experiments was proposed. An aqueous solution of 145 kDa poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] was prepared and successfully utilized to support sectioning of fragile samples, such as mouse lungs or an insect body. In contrast to the traditional embedding media, pHPMA solution does not contaminate mass spectra with intense background peaks and minimizes the ion suppression effect in MALDI ionization. This medium is applicable for mass spectrometry imaging of various compounds from the low-mass region, such as lipids and small metabolites, up to the high-mass region, such as proteins. Although its potentials were demonstrated on the very specific tissue samples, it is generally applicable on common tissues as well.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: strohalm@biomed.cas.cz.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LC545), Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (IAAX00500803),

Czech Science Foundation (P206/10/P018) and Institutional Research Concept (AV0Z50200510). Ms. Helena Mišurcová is gratefully acknowledged for the lung sample preparations.

REFERENCES

- (1) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 676–681.
- (2) Pól, J.; Strohalm, M.; Havlíček, V.; Volný, M. *Histochem. Cell Biol.* **2010**, *134*, 423–443.
- (3) Caldwell, R. L.; Caprioli, R. M. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 394–401.
- (4) Walch, A.; Rauser, S.; Deininger, S. O.; Höfler, H. *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130*, 421–434.
- (5) Goodwin, R. J.; Pennington, S. R.; Pitt, A. R. *Proteomics* **2008**, *8*, 3785–3800.
- (6) Watrous, J. D.; Alexandrov, T.; Dorrestein, P. C. *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46*, 209–222.
- (7) Kawamoto, T. *Arch. Histol. Cytol.* **2003**, *66*, 123–143.
- (8) Schwartz, S. A.; Reyzer, M.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 699–708.
- (9) Chen, R.; Hui, L.; Sturm, R. M.; Li, L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 1068–1077.
- (10) DeKeyser, S. S.; Kutz-Naber, K. K.; Schmidt, J. J.; Barrett-Wilt, G. A.; Li, L. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1782–1791.
- (11) Khatib-Shahidi, S.; Andersson, M.; Herman, J. L.; Gillespie, T. A.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6448–6456.
- (12) Stoeckli, M.; Staab, D.; Schweitzer, A. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260*, 195–202.
- (13) Zaima, N.; Goto-Inoue, N.; Hayasaka, T.; Setou, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2723–2729.
- (14) Kopeček, J. *Biomaterials* **1984**, *5*, 19–25.
- (15) Kopeček, J.; Kopečková, P. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 122–149.
- (16) Ulbrich, K.; Subr, V.; Strohalm, J.; Plocová, D.; Jelínková, M.; Říhová, B. *J. Controlled Release* **2000**, *64*, 63–79.
- (17) Scales, C. W.; Vasilieva, Y. A.; Convertine, A. J.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1846–1850.
- (18) Strohalm, M.; Kavan, D.; Novák, P.; Volný, M.; Havlíček, V. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4648–4651.